

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša FRANGEŽ

**VPLIV VRSTE VZORCEV, OBOGATITVE IN  
METODE ODKRIVANJA NA UČINKOVITOST  
DETEKCIJE TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ  
RODU *Campylobacter***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tjaša FRANGEŽ

**VPLIV VRSTE VZORCEV, OBOGATITVE IN METODE ODKRIVANJA  
NA UČINKOVITOST DETEKCIJE TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ  
RODU *Campylobacter***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**IMPACT OF SAMPLE TYPE, ENRICHMENT AND DETECTION  
METHOD ON EFFICIENCY OF THERMOTOLERANT *Campylobacter*  
DETECTION**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Recenzentka: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Frangež

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 579.24 : 579.6.083 : 577.2.083 (043) = 163.6  
KG patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter*/mikrobiološke metode/ klasične gojitvene metode/obogatitvena gojišča/molekularne metode/PCR v realnem času/meja detekcije/površinske vode/piščančje meso/mesni pripravki  
AV FRANGEŽ, Tjaša  
SA SMOLE MOZINA, Sonja (mentorica)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2010  
IN VPLIV VRSTE VZORCEV, OBOGATITVE IN METODE ODKRIVANJA NA UČINKOVITOST DETEKCIJE TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU *Campylobacter*  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 61 str., 19 pregl., 17 sl., 4 pril., 88 vir.  
IJ sl  
JI sl / en  
AI Cilj raziskave je bil preučiti vpliv tipa vzorca, obogatitve in metode odkrivanja na učinkovitost detekcije *Campylobacter* v vzorcih hrane in vode. Detekcija kampilobaktrov v takšnih vzorcih je težavna, ker je prisotno majhno število celic v primerjavi s kompetitivno mikrobioto. Preučevali smo naravno in načrtno kontaminirane vzorce perutnine (N = 136; sveže, načrtno kontaminirane, zamrznjene, marinirane) in vode (N = 136; površinska in pitna). Primerjali smo 4 različna obogatitvena gojišča, in sicer Preston, Bolton, Bolton brez krvi in Bolton s spremenjenimi dodatki za selektivnost (cefoperazon, amfotericin B, teikoplanin; CAT). Prav tako smo ocenili učinkovitost obogatitvenega razmerja 1:9, ki je predpisan po standardu ISO 10272-1, v primerjavi z obogatitvijo 25 g vzorca v 100 ml obogatitve (1:4). Vzorce smo inkubirali pri 41,5 °C (hrana) ali 37 °C (voda) 48 ur v mikroaerofilnih pogojih in uporabili gojišče mCCDA za izolacijo kulture *Campylobacter*. Poleg tega smo izvedli PCR v realnem času za odkrivanje kampilobaktrov iz obogatitve. Molekularna detekcija se je izkazala za bolj učinkovito kot klasična. To je potrdilo uporabo PCR v realnem času, kot učinkovitejše orodje za kvantitativno oceno tveganja za rod *Campylobacter*. Optimalna obogatitev je odvisna od vrste vzorca in metode odkrivanja. Ne glede na učinek vrste vzorca je gojišče Bolton dalo najboljše rezultate v kombinaciji z metodo ISO, gojišče Bolton + CAT pa v kombinaciji s PCR v realnem času. Vendar pa na rezultat vpliva vrsta vzorca. Gojišče Bolton + CAT je bilo optimalno za okoljske vzorce vod, gojišče Bolton brez krvi pa za vzorce mesa. S tem smo potrdili, da kri v gojišču ni bila ključnega pomena za rast bakterij, prav tako ni zavirala PCR reakcije. Glede na vrednosti praznega cikla (Ct) je obogatitveno razmerje 1:4 bolj učinkovito pri odkrivanju od razmerja 1:9. Meja zaznavnosti načrtno kontaminiranih vzorcev piščančjega mesa in vzorcev pitne vode je bila 1 CFU/ml, vendar pa najbolj zanesljivo z detekcijo s PCR po obogatitvi v gojišču Bolton brez krvi. Optimalna obogatitev je odvisna od tipa vzorcev in metode odkrivanja. Iz praktičnega in ekonomskega vidika, bi bilo smiselno uporabiti obogatitveno razmerje 1:4 namesto standardnega razmerja 1:9.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24 : 579.6.083 : 577.2.083 (043) = 163.6  
CX pathogens/*Campylobacter*/microbiological methods/culturing methods/ enrichment media/molecular methods/real time PCR/limit of detection/environmental water/chicken meat/marinated meat  
AU FRANGEŽ, Tjaša  
AA SMOLE MOZINA, Sonja (supervisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2010  
TI IMPACT OF SAMPLE TYPE, ENRICHMENT AND DETECTION METHOD ON EFFICIENCY OF THERMOTOLERANT *Campylobacter* DETECTION  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIII, 61 p., 19 tab., 17 fig., 4 ann., 88 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of the study was to determine the impact of sample type, enrichment and detection method on efficiency of *Campylobacter* detection in food and environmental samples since this could be difficult due to low numbers and overgrowth of competitive microbiota. Natural and spiked samples of chicken meat (N=136; fresh, spiced, frozen, marinated) and water (N=136; drinking, environmental surface water) were studied. Bolton, Preston, blood free Bolton and Bolton base broth with changed supplements for selectivity (Cefoperazone, Amphotericin B, Teicoplanin; CAT) were compared for enrichment. Beside the standard ISO 10272-1 enrichment ratio (1:9), the effectiveness of enriching 25 g sample in 100 ml Bolton broth (1:4) was assessed. Enrichment was performed at 41,5°C (food) or 37°C (environmental samples) for 48 hours in microaerophilic conditions, mCCDA medium was used for isolation of *Campylobacter* culture. Furthermore, real-time PCR detection of thermotolerant campylobacters from enrichment was performed. Molecular detection was more effective than classical culturing – this confirmed the potential of real-time PCR as more efficient tool for *Campylobacter* quantitative risk assessment. Optimal enrichment broth depended on sample type and detection method. Regardless to the matrix effect, Preston broth gave optimal results in culture detection, but Bolton + CAT enrichment resulted in optimal real-time PCR detection. However, the results were influenced by sample type as well. Bolton + CAT was optimal for environmental water samples, but blood free Bolton for meat samples. Thus, blood was not essential for enrichment culturing, but also did not inhibit subsequent PCR amplification. According to the Treshold cycle (Ct) values, the 1:4 enrichment ratio was more effective for detection than the 1:9 enrichment ratio. Detection limit for spiked samples of chicken meat and drinking water samples was in all combinations 1 CFU/ml, but most reliably with PCR detection after enrichment in blood free Bolton medium. Optimal enrichment broth should be selected according to the sample type and method of *Campylobacter* detection. From practical and economic point of view, it would be prudent to use the 1:4 enrichment ratios instead of the standard 1:9 ratio.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD</b>	
1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZGODOVINA RODU <i>Campylobacter</i> .....	3
2.2 TAKSONOMIJA .....	3
2.3 ORGANIZEM IN NJEGOVE LASTNOSTI .....	5
2.4 PATOGENEZA IN KLINIČNE POTEZE .....	6
<b>2.4.1 Enteritis .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4.2 Sistemske infekcije in zapleti .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.3 Zdravljenje .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.4 Virulenčni dejavniki .....</b>	<b>7</b>
2.4.4.1 Gibljivost .....	7
2.4.4.2 Adhezivnost in invazivnost .....	8
2.4.4.3 Citotoksični toksin .....	8
2.5 EPIDEMIOLOGIJA .....	8
2.6 REZERVOAR BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> V ŽIVILIH .....	9
<b>2.6.1 Perutnina .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6.2 Ostala živila .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6.3 Mleko .....</b>	<b>10</b>
<b>2.6.4 Pitna voda .....</b>	<b>10</b>
<b>2.6.5 Ukrepi .....</b>	<b>10</b>
2.7 ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM .....	10
2.8 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA .....	11

<b>2.8.1 Klasična gojitvena metoda</b> .....	<b>11</b>
2.8.1.1 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v vodi.....	13
2.8.1.2 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v perutnini.....	14
2.8.1.3 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v mesnih pripravkih.....	14
<b>2.8.2 Molekularne metode</b> .....	<b>15</b>
2.8.2.1 PCR v realnem času.....	15
2.8.2.1.1 TaqMan označevalec.....	16
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>19</b>
3.1 POTEK DELA.....	19
3.2 MATERIALI.....	20
<b>3.2.1 Vzorci živil</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.2 Mikroorganizmi</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.3 Gojišča</b> .....	<b>20</b>
3.2.3.1 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston.....	20
3.2.3.2 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton.....	21
3.2.3.3 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton brez krvi.....	22
3.2.3.4 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton s spremenjenimi dodatki za selektivnost.....	23
3.2.3.5 Trdno selektivno gojišče mCCDA (modificirani ogljeni cefoperazon deoksiholatni agar).....	23
3.2.3.6 Trdno gojišče Mueller Hinton.....	24
<b>3.2.4 Reagenti in raztopine</b> .....	<b>24</b>
3.2.4.1 Detekcija hidrolize indoksil acetata.....	24
3.2.4.2 Detekcija hidrolize hipurata.....	25
3.2.4.3 Detekcija občutljivosti na nalidiksično kislino in cefalotin.....	25
3.2.4.4 Reagenti za izolacijo DNA s setom QIAamp Mini Kit.....	25
3.2.4.5 Reagenti za pripravo mešanice PCR.....	26
<b>3.2.5 Laboratorijski pribor in oprema</b> .....	<b>26</b>
3.3 METODE.....	27
<b>3.3.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v perutninskem mesu in mesnih pripravkih s klasično metodo (ISO 10272-1)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3.2 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v vodi s klasično metodo (ISO 17995)</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3.3 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v vodi, perutninskem mesu in mesnih pripravkih z molekularnimi metodami</b> .....	<b>29</b>
3.3.3.1 Izolacija DNA s setom QIAamp Mini Kit.....	29
3.3.3.2 Priprava mešanice za pomnoževanje.....	29
<b>3.3.4 Ugotavljanje meje občutljivosti klasične in molekularne metode</b> .....	<b>32</b>

<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 UČINKOVITOST OBOGATITVE GLEDE NA TIP VZORCEV IN METODO ODKRIVANJA TERMOTOLERANTIH KAMPILOBAKTROV V NARAVNO KONTAMINIRANIH VZORCIH.....	33
4.1.1 Vzorci naravno kontaminiranih površinskih vod .....	33
4.1.2 Vzorci naravno kontaminiranega piščančjega mesa.....	35
4.1.3 Vzorci naravno kontaminiranih mesnih pripravkov .....	37
4.1.4 Vzorci naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa.....	38
4.1.5 Občutljivost in selektivnost posamezne obogatitve .....	40
4.1.6 Primerjava občutljivosti metod glede na tip vzorcev .....	40
4.2 UČINKOVITOST DETEKCIJE IN IZOLACIJE Z OBOGATITVIJO V RAZMERJU 1:4 V PRIMERJAVI Z OBOGATITVIJO V RAZMERJU 1:9 .....	41
4.3 MEJA OBČUTLJIVOSTI KLASIČNE IN MOLEKULARNE DETEKCIJE KAMPILOBAKTROV V NAČRTO KONTAMINIRANIH VZORCIH.....	43
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>46</b>
5.1 RAZPRAVA.....	46
5.1.1 Učinkovitost obogatitve glede na tip vzorcev in metodo odkrivanja .....	46
5.1.1.1 Vzorci naravno kontaminiranih površinskih vod.....	46
5.1.1.2 Vzorci naravno kontaminiranega piščančjega mesa .....	47
5.1.1.3 Vzorci naravno kontaminiranih mesnih pripravkov .....	48
5.1.1.4 Vzorci naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa.....	48
5.1.1.5 Selektivnost posamezne obogatitve .....	48
5.1.1.6 Primerjava občutljivosti metod glede na tip vzorcev.....	49
5.1.2 Učinkovitost izolacije z obogatitvijo v razmerju 1:4 v primerjavi z obogatitvijo v razmerju 1:9 .....	49
5.1.3 Meja občutljivosti klasične in molekularne detekcije kampilobaktrov v načrtno kontaminiranih vzorcih.....	50
5.1.3.1 Občutljivost detekcije v naravno in načrtno kontaminiranih vzorcih.....	51
5.2 SKLEPI.....	52
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>53</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>54</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Prikaz biokemičnih lastnosti termofilnih kampilobaktrov (ISO 10272-1: 2006).....	12
<b>Preglednica 2:</b> Sestavine dodatka za rast v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E)).....	21
<b>Preglednica 3:</b> Sestavine dodatka za selektivnost v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E)). ...	21
<b>Preglednica 4:</b> Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton (Oxoid CM0983).....	22
<b>Preglednica 5:</b> Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid SR0183).....	22
<b>Preglednica 6:</b> Sestava dodatka za selektivnost v Boltonu + CAT (Oxoid SR0174).....	23
<b>Preglednica 7:</b> Sestava osnovnega medija CCDA (Oxoid CM0739).....	23
<b>Preglednica 8:</b> Sestava dodatka za selektivnost CCDA (Oxoid SR0155).....	23
<b>Preglednica 9:</b> Sestava osnovnega medija Mueller Hinton.....	24
<b>Preglednica 10:</b> Prikaz reagentov (in njihovih količin), ki so potrebni za analizo 1 vzorca z PCR v realnem času.....	30
<b>Preglednica 11:</b> Prikaz pogojev reakcije za izvedbo PCR v realnem času za določanje termotolerantnih bakterij <i>Campylobacter</i> .....	31
<b>Preglednica 12:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v naravno kontaminiranih vzorcih površinskih vod glede na uporabljeno metodo.....	34
<b>Preglednica 13:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranega piščančjega mesa glede na uporabljeno metodo. ....	35
<b>Preglednica 14:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranih mesnih pripravkov glede na uporabljeno metodo. ....	37
<b>Preglednica 15:</b> Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa glede na uporabljeno metodo. ....	38
<b>Preglednica 16:</b> Detekcija kampilobaktrov s klasično (ISO 10272) in molekularno metodo (PCR v realnem času) po obogatitvi v gojišču Bolton v razmerju 1:4 in razmerju 1:9 iz naravno kontaminiranih vzorcev piščančjega mesa in mesnih pripravkov. ....	42

<b>Preglednica 17:</b> Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v načrtno kontaminirani pitni vodi. ....	43
<b>Preglednica 18:</b> Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v načrtno kontaminiranih mesnih pripravkih. ....	44
<b>Preglednica 19:</b> Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo v načrtno kontaminiranem zamrznjenem piščančjem mesu .....	45

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Trenutni seznam članov družine <i>Campylobacteraceae</i> (Humphrey in sod., 2007) .....	4
<b>Slika 2:</b> Rast bakterij <i>Campylobacter</i> na gojišču mCCDA (nacepitev direktno iz obogatitve).....	5
<b>Slika 3:</b> Rast bakterij <i>Campylobacter</i> na gojišču mCCDA (precepitev do posameznih kolonij). .....	5
<b>Slika 4:</b> Grafični prikaz poteka PCR v realnem času z označevalcem TaqMan (BIOMMED, 2010).....	16
<b>Slika 5:</b> Shema poskusa.....	19
<b>Slika 6:</b> Potek določanja kampilobaktrov v perutninskem mesu in mesnih pripravkih s klasično metodo.....	27
<b>Slika 7:</b> Potek določanja kampilobaktrov v vodi s klasično metodo. ....	28
<b>Slika 8:</b> Steklene kapilare za PCR v realnem času v aparatu.....	30
<b>Slika 9:</b> Rotor z vstavljenimi kampilarami (od zgoraj).....	31
<b>Slika 10:</b> Rotor z vstavljenimi kampilarami (od spodaj). ....	31
<b>Slika 11:</b> Izvajanje PCR v realnem času s sočasnimi prikazom rezultatov na računalniku. ....	31
<b>Slika 12:</b> Število odkritih pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranih površinskih vod. ....	34
<b>Slika 13:</b> Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranega piščančjega mesa. ....	36
<b>Slika 14:</b> Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranih mesnih pripravkov.....	37
<b>Slika 15:</b> Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa. ....	39

<b>Slika 16:</b> Primerjava učinkovitosti detekcije s klasično (ISO 10272-1 in 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) po obogatitvi, glede na uporabljeno obogatitveno gojišče, za vse vzorce vključene v raziskavo.....	40
<b>Slika 17:</b> Primerjava občutljivosti klasične (ISO 10271-1 in 17995) in molekularne metode (PCR v realnem času) glede na vrste vzorcev, ki so bili vključeni v raziskavo. ....	41

## KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih površinskih vod.
- Priloga B:** Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranega piščančjega mesa .
- Priloga C:** Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih mesnih pripravkov.
- Priloga D:** Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AE	elucijski pufer (ang. Elution buffer)
AL	lizirajoči pufer (ang. Lysis buffer)
ATL	tkivno-lizirajoči pufer (ang. Tissue Lysis buffer)
AW	pralni pufer (ang. Wash buffer)
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
CAT	dodatek antibiotikov, ki vsebuje cefoperazon, amfotericin B in teikoplanin
CDT	citotoksični toksin (angl. Cytholethal Distending Toxin)
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Unit)
Ct	pražni cikel (angl. Treshold Cycle)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
G+C	gvanin in citozin
GBS	Guillain-Barrèov sindrom
ISO	mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. International Organization for Standardization)
mCCDA	modificirani ogljeni cefoperazon deoksiholatni agar (angl. modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction),
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina
ULRS	Uradni List Republike Slovenije
VBNC	živo, vendar neogljivo stanje (angl. Viable But Not Culturable)

## 1 UVOD

Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter*, predvsem *C. jejuni*, sodijo med najbolj pogoste vzroke gastroenteritisa pri ljudeh v industrializiranih državah. Pogosto so povezani s porabo kontaminiranega piščančjega mesa, surovega mleka in vode. Tudi druga živila lahko postanejo vir okužb zaradi navzkrižne kontaminacije, prav tako tudi delovne površine med samo pripravo hrane. Študije so pokazale, da je 80 % piščančjega mesa, prodanega končnim kupcem, kontaminiranega s *C. jejuni*, kar poudarja pomembnost piščančjega mesa kot rezervoarja in vira okužbe s *C. jejuni* (Van Deun in sod., 2007).

Število infekcij je nekoliko upadlo v razvitih delih sveta skozi leta, toda na splošno ostaja nujna potreba po razumevanju, kako se ta bolezen prenaša s hrano in na druge načine. Vedno večje število izolatov bakterij rodu *Campylobacter* kaže odpornost na antibiotike, kar predstavlja dodatno skrb, saj takšni sevi povzročijo daljše ali hujše bolezni kot sevi, ki so občutljivi na antibiotike (Moore in sod., 2005). Prav tako je bilo ugotovljeno, da je visoka pojavnost kliničnih bolezni povezana z majhno infektivno dozo teh organizmov (Robinson, 1981). Njihove potencialno resne posledice potrjujejo dejstvo, da te bakterije predstavljajo tveganje za javno zdravstvo (Tauxe, 2002).

Kampilobaktri so relativno počasi rastoči mikroorganizmi z inertnimi biokemičnimi značilnostmi, zaradi česar je identifikacija in diferenciacija z metodami gojenja med vrstami znotraj rodu *Campylobacter* dolgotrajna in zahtevna. Na natančnost rezultatov nekaterih biokemijskih poskusov vpliva tudi velikost bakterijskega inokuluma, katero je zelo težko nadzorovati. Poleg tega so celice običajno prisotne v zelo majhnem številu, zaradi česar so lahko hitro poškodovane v samih živilih in vodi ter posledično lahko izgubijo sposobnost rasti oz. se spremenijo v negojljive (VBNC) oblike. Zaradi navedenega so metode, ki temeljijo na odkrivanju nukleinskih kislin, postale pomembna alternativa za odkrivanje kampilobaktrov (Wang in sod., 2001).

V raziskovalnem delu te diplomske naloge smo se na podlagi navedenih dejstev osredotočili na iskanje obogatitve, ki omogoča optimalno detekcijo termotolerantnih kampilobaktrov v površinskih vodah, perutninskem mesu in mesnih pripravkih (t.j. meso, ki ima dodana druga živila, začimbe ali dodatke oz. meso, ki je bilo obdelano s postopkom, ki ne spreminja notranje celične zgradbe mesa, zaradi česar bi značilnosti svežega mesa izginile; Pravilnik o kakovosti perutninskih mesnih izdelkov, 2005). Detekcijo smo izvedli z molekularno metodo in metodo gojenja. Slednjo smo izvajali po mednarodnem standardu ISO 10272-1 za vzorce živil oz. ISO 17995 za vzorce vode.

## 1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA

Namen našega dela je bil izboljšati detekcijo termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* z molekularno in klasično gojitveno metodo. Čeprav so tradicionalne metode dolgotrajne in težavne, so še vedno nepogrešljive pri epidemioloških študijah in spremljanju razvoja odpornosti proti protimikrobnim zdravilom. Da bi se ognili težavni izolaciji, smo hoteli poiskati obogatitev, ki bi najbolje zavirala rast kompetitivne mikrobiote ter obenem najmanj škodovala rasti bakterij rodu *Campylobacter*. Cilji, ki smo si jih postavili, so bili naslednji:

- določiti optimalno selektivno obogatitev za različne vrste vzorcev živil ter s tem doseči učinkovitejšo detekcijo kampilobaktrov oziroma čim boljšo občutljivost klasične gojitvene in molekularne metode;
- preučiti učinkovitost odkrivanja prisotnosti kampilobaktrov z obogatitvijo v razmerju 1:4 (25 g vzorca : 100 ml obogatitvenega gojišča), v primerjavi z razmerjem 1:9, ki ga navaja ISO standard 10272-1;
- ugotoviti katera metoda (klasična ali molekularna) je bolj učinkovita za dokazovanje kampilobaktrov.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da:

- obogatitveno gojišče Bolton, ki se uporablja po standardu ISO 10272-1, vsebuje kri, ki lahko inhibira PCR reakcijo. Zato bomo z obogatitvijo v gojišču Bolton brez krvi dosegli nižje vrednosti Ct (angl. threshold cycle) v primerjavi z obogatitvijo, ki vsebuje kri;
- z zamenjavo antibiotikov v gojišču Bolton bomo dobili bolj selektivno obogatitev, ki bo zavrla rast kompetitivne mikrobiote, predvsem enterokokov, ki pogosto prerastejo kampilobakte;
- obogatitev v razmerju 1:4 bo enako ali bolj učinkovita kot obogatitev v razmerju 1:9.



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA RODU *Campylobacter*

Vrsta *Campylobacter* je bila prvič opisana in izolirana leta 1913 s pomočjo McFadyena in Stockmana kot pomemben vzrok spontanah splavov in neplodnosti goveda in ovc (Hansson, 2007). Pet let kasneje je Smith odkril spiralne bakterije v splavljenih plodih goveda in zaključil na podlagi potrditvenih testov, da njegovi izolati in vibriji, katere sta našla McFadyean in Stockman, pripadajo isti vrsti. Predlagal je ime *Vibrio fetus* (Blaser in sod., 2000). V poznih 1950-ih letih je Elizabeth King opisala *Campylobacter* spp. izolirane iz krvnih vzorcev otrok, ki so imeli diarejo. Opisala je 3 pomembne lastnosti, in sicer:

- optimalna temperatura za te bakterije je 42 °C;
- bakterije so izolirane iz ljudi z akutno diarejo;
- humanih sevov ni mogoče razlikovati od sevov, izoliranih iz piščancev.

Kingova je predlagala dva različna tipa vibrijev, povezanih z enteričnimi boleznimi - prvo skupino *V. fetus*, in drugo, termofilno skupino, izolirano v naravi (King, 1957).

Rod *Campylobacter* (pomeni ukrivljena palčka) je bil opisan leta 1963 (Sebald in Veron, 1963), ko so ugotovili, da organizem ne more uporabljati sladkorjev in ima različno G+C sestavo kot *Vibrio* spp. (Moore in sod., 2005). Leta 1970 so z razvojem primernih selektivnih gojišč ugotovili, da sta *Campylobacter jejuni* in v manjšem obsegu *Campylobacter coli* glavna vzroka diareje (Adams in Moss, 2008). Delo Kingove je bilo podprto z delom Dekeyser in Butzler leta 1972 (Moore in Matsuda, 2002), ko je bil razvit postopek izolacije za termofilne kampilobakte. Ta metoda je vsebovala filtracijo vzorcev blata skozi filtre z 0,64µm velikimi membranskimi porami in inokulacijo filtrov na agar. Metoda se je izkazala za preveč okorno in leta 1977 je Martin Skirrow opisal preprosto tehniko na podlagi direktne kulture blata na krvnem agarju, ki je vseboval vankomicin, polimiksin in trimetoprim (Skirrow, 1977). Plošče so inkubirali pri 43 °C v mikroaerofilni atmosferi, ki je vsebovala 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> in 85 % N<sub>2</sub>. Od takrat dalje so bile narejene številne metodološke spremembe in opisane mnoge različice standardne metode, ki jih rutinski diagnostični mikrobiološki laboratoriji prav tako uporabljajo za izolacijo kampilobatrov (Moore in sod., 2005).

### 2.2 TAKSONOMIJA

Taksonomska struktura rodu *Campylobacter* se je skozi leta spreminjala (Goodwin in sod., 1989; Vandamme in de Ley, 1991; Vandamme in On, 2001). Prejšnja taksonomija je temeljila predvsem na fenotipskih podatkih, kot so serološke in biokemične značilnosti. Vendar pa je uporaba molekularnih metod v bakteriologiji povečala znanje o biološki raznovrstnosti v bakteriologiji in tudi znotraj rodu *Campylobacter*. Analize zaporedja 16S

rRNA so se izkazale za koristne evolucijske študije v bakterijologiji (Woese, 1987), kar je imelo zelo pomemben vpliv na spremembe v taksonomiji bakterij (Ludwig in Klenk, 2001).

**Domena:** *Bacteria*

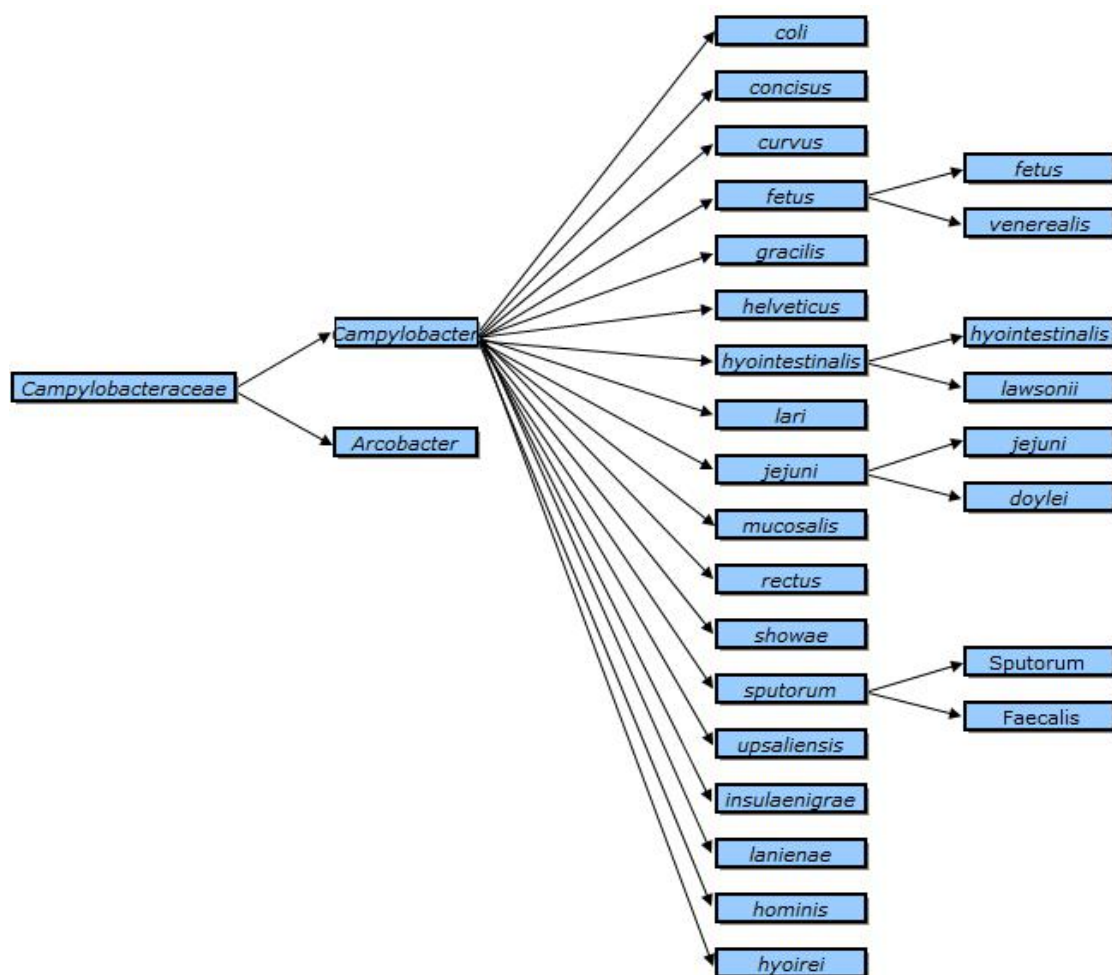
**Deblo:** *Proteobacteria*

**Razred:** *Epsilonproteobacteria*

**Red:** *Campylobacterales*

**Družina:** *Campylobacteraceae*

**Rod:** *Campylobacter*



Slika 1: Trenutni seznam članov družine *Campylobacteraceae* (Humphrey in sod., 2007).

## 2.3 ORGANIZEM IN NJEGOVE LASTNOSTI

Vrste rodu *Campylobacter* so po Gramu negativne, oksidaza in katalaza pozitivne bakterije. Celice so ukrivljene, spiralne oz. S - oblike, široke od 0,2 – 0,8  $\mu\text{m}$  in dolge 0,5 – 5  $\mu\text{m}$ . Bakterije ne tvorijo spor in ne fermentirajo ali oksidirajo ogljikovih hidratov. So gibljive in se premikajo z značilnim hitrim kroženjem, podobnim spiralnemu gibanju, z enopolarnim ali bipolarnim bičkom (Humphrey in sod., 2007).

Kampilobaktri so razmeroma počasi rastoče bakterije, ki zahtevajo posebne pogoje za gojenje. So mikroaerofilni, toda nekatere vrste rastejo aerobno ali anerobno (Hansson, 2007). Poleg tega se lahko kampilobaktri pri različnih stresnih pogojih ali v primeru starih kultur spremenijo v kokoidno obliko. Dokumentirano je bilo, da pri neželenih naravnih pogojih preidejo v negojljive oblike. Takih organizmov ne moremo izolirati z metodami gojitve, toda vseeno ostajajo infektivni (Rollinson in Colwell, 1986). Vendar kokoidna oblika ni nujno povezana z nesposobnostjo gojenja oz. rastjo na gojiščih (Klančnik, 2006). Najbolje rastejo pri nižani koncentraciji kisika v atmosferi s 5 – 10 %  $\text{CO}_2$  in 3 – 5 %  $\text{O}_2$  na hranilnih gojiščih s 5-10 % krvi (Hansson, 2007). Vse vrste bakterij rodu *Campylobacter* rastejo pri 37 °C. Vrste *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* in *C. upsaliensis*, katere so poimenovali termofilni kampilobaktri, imajo optimalno rast pri 42 – 43 °C (Hansson, 2007). Ne rastejo pod 30 °C in slabo preživijo pri sobni temperaturi. Njihova sposobnost preživetja pada pri ohlajanju ali zamrzovanju, kljub temu pa obstaja možnost, da preživijo pri teh pogojih daljše obdobje. So tudi občutljivi na ostale neželene pogoje, kot je sušenje in znižanje pH (Adams in Moss, 2008).

Morfologija kolonij na agarških gojiščih se znatno razlikuje glede na osnovno gojišče, bakterijski sev, stopnjo vlage na površini agarja, čas in temperaturo inkubacije. Zato se morfologija kolonij ne sme uporabljati kot glavni razpoznavni dejavnik pri določitvi vrste in rodu *Campylobacter* (Giriboni De Mello, 2002). Kljub temu najbolj tipična morfologija variira od krožnih kolonij do nepravilnih z gladkimi robovi, ki so značilno sivkaste in rahlo rožnate barve s kovinskim sijajem na kri vsebujočih agarjih. Na gojiščih, ki temeljijo na oglju, rastejo sivkasto do bele kolonije s kovinskim sijajem (Hansson, 2007).



Slika 2: Rast bakterij *Campylobacter* na gojišču mCCDA (nacepitev direktno iz obogatitve).



Slika 3: Rast bakterij *Campylobacter* na gojišču mCCDA (precepitve do posameznih kolonij).

## 2.4 PATOGENEZA IN KLINIČNE POTEZE

Glede na vrsto bolezni in pomembnosti bakterije *Campylobacter* za javno zdravstvo je presenetljivo slabo poznana njegova ekologija, epidemiologija in patogeneza (Dorrell in sod. 2001).

Diagnozo kampilobakterioze lahko postavimo samo z odkrivanjem kampilobaktrov v blatu (Hansson, 2007). Glavna vrsta, vpletena pri infekcijah s kampilobaktri, je *C. jejuni*, ki je odgovoren za 80 – 85 % vseh enteričnih infekcij kampilobaktrov pri ljudeh in *C. coli* kot druga (10-15 %). Ostali kampilobaktri, kot so *C. lari*, *C. upsaliensis* in *C. fetus* so redko potrjeni (Lastovica in Le Roux, 2001).

Infektivna doza je odvisna od števila in drugih vplivov, vključno z virulenco seva, načinom vnosa in občutljivosti vsakega posameznika. Pri visoko izpostavljenih posameznikih se razvije imunost in infekcija postane subklinična. Obratno pa zmanjšani imunski odziv, ki se pojavlja pri starejših ljudeh ali pri kroničnih bolnikih (diabetes, ciroza, rak, imuno supresija, HIV), poveča tveganje razvoja različnih infekcij (Sorvillo in sod., 1991).

Iz nepoznanega razloga je moški spol pomemben rizični faktor za infekcijo s kampilobaktri. Poleg tega se je pokazalo, da je zmanjšana kislost v želodcu dejavnik tveganja (Neal in sod., 1996).

Med okužbo s to bakterijo pri ljudeh nastanejo vsi imunoglobulinski razredi. Od teh je IgA najbolj pomemben, saj lahko prečka steno črevesja kot odgovor na napad bakterije. Poleg tega IgA zagotavlja kratkoročno imunost za gostitelja proti ponavljajočim se okužbam istega organizma. Drugi imunoglobulini ne prehajajo skozi steno črevesja, temveč delujejo na bakterije, ki vstopajo v krvni obtok, s čimer preprečujejo bakteriemijo (Wallis, 1994).

### 2.4.1 Enteritis

*Campylobacter* najprej kolonizira tanko črevesje in se nato razširi še v debelo črevo, katero je tarčni organ bolezni (Poly in Guerry, 2008). Povzročajo akutni enterokolitis, katerega ni lahko razlikovati od bolezni, ki jih povzročajo drugi patogeni (Ketley, 2007). V primerjavi z infekcijami bakterij *Salmonella* ali *Shigella* so infekcije s kampilobaktri ponavadi manj akutne (v manjšem obsegu prisotna vročina in splošni simptomi), a večkrat ponovljive, če ni izvedeno zdravljenje (Moore in sod., 2005). Bolezni, ki jih povzroča infekcija s kampilobaktri, variirajo od blage, samoomejujoče diareje do hude, vnetne, krvave diareje, ki traja nekaj tednov (Dorrell in sod., 2001). Obdobje inkubacije je lahko 1 - 11 dni, najbolj pogosto pa 3 - 5 dni. Klinični znaki, ki se pokažejo, so slabo počutje, vročina, hude abdominalne bolečine in diareja, kot poglaviti simptom (Adams in Moss, 2008).

## 2.4.2 Sistemske infekcije in zapleti

Obstaja vrsta kampilobaktrov, to je *C. fetus*, katera je redko najdena pri enteritisih, je pa pogosto izolirana pri sistemske infekciji. Čeprav so komplikacije redke, se reaktivni artritis, urtikarija in nadozni eritem lahko razvijejo. Poleg tega so kampilobaktri invazivne bakterije, ki se lahko translocirajo in dosežejo pretok krvi. Veliko tkiv je lahko vpletenih, posebno žilni endotelij (anevrizme, tromboflebitis, endokarditis), kosti, meningitis, itd. Te infekcije morajo biti intenzivno zdravljene zaradi slabe prognoze (Moore in sod., 2005).

Obstaja tudi možnost, da lahko posamezniki z boleznijo utrpijo nevrološke posledice več mesecev ali let pozneje (Lindsay, 1997; Ang in sod., 2001). Dve nevropatiji sta povezani z okužbo s *C. jejuni*, in sicer Guillain-Barré sindrom (GBS) in Miller-Fisher sindrom (MFS; različica GBS). GBS sindrom je akutna demijelizacijska bolezen, ki prizadene periferne nevrone. Značilna je naraščajoča paraliza. Razvoj GBS je povezan z lipooligosaharidi (LOS), ki posnemajo humane gangliozide. Zato proizvodnja protiteles proti strukturi sredice LOS kampilobaktrov povzroči avtoimunski odziv, ki prizadene periferne živce (Poly in Guerry, 2008).

## 2.4.3 Zdravljenje

Zdravljenje je koristno, če nastopi dovolj zgodaj v poteku bolezni (Salazar-Lindo, 1986). Če bakterije še niso razvile odpornosti, so priporočljiva zdravila eritromicin, amoksicilin, fluorokinoloni ali tetraciklini (Moore in sod., 2005). Eritromicin velja za enega izmed najbolj varnih in učinkovitih zdravil proti kampilobakteriozi.

Zdravljenje sistemskih infekcij pa temelji predvsem na gentamicinu, amoksiciklinu, ciprofloksacinu ali imipenemu (Moore in sod., 2005).

## 2.4.4 Virulenčni dejavniki

Določeni virulenčni dejavniki so zelo pomembni za indukcijo gastroenteritisa, kot je rezistenca na žolčne soli, invazija skozi epitelne celice in produkcija citoletalnega toksina (ang. Cytolethal Distending Toxin; CDT). Tudi gibljivost, kemotaksa, spiralna morfologija in sposobnost pritrjevanja (adhezivnost) celic se štejejo kot pomembni dejavniki virulence (Van Deun in sod., 2007).

### 2.4.4.1 Gibljivost

Gibljivost, ki jo bakterijam omogoča biček na enem ali obeh koncih bakterije, ima pomembno vlogo pri virulenci, ker je to pogoj, da bakterije dosežejo mesto za pripenjanje in za prodor v črevesne celice. Biček kampilobaktrov ima precej širšo vlogo kot pa zgolj zagotavljanje

giblivosti bakterije. Menijo, da lahko biček igra tudi vlogo v internalizaciji in prenosu *C. jejuni*. Kampilobaktri lahko vstopijo v enterocite, kar lahko odraža patogeni mehanizem, s katerim lahko ta organizem pridobi dostop do submukoznega tkiva in kasneje vodi do poškodb tkiva in vnetja (Giriboni De Mello, 2002).

#### 2.4.4.2 Adhezivnost in invazivnost

Flagel pospešuje in olajšuje pritrnitev na epitelne celice, medtem ko so različni adhezini povezani na številnih mestih z receptorji epitelnih celic, odgovorni za čvrsto povezanost obeh. Bakterijska invazija povzroča poškodbe epitelnih celic *in vivo*, izgubo celičnih funkcij in drisko. *C. jejuni* je eden izmed peščice invazivnih patogenih bakterij, sposobnih s pomočjo reorganizacije citoskeleta vstopiti v gostiteljsko celico, se premikati in tudi razmnoževati znotraj njih (Snelling in sod., 2004; Šikić, 2007).

#### 2.4.4.3 Citotoksični toksin

Najbolje opisan virulenčni faktor v jedru genoma *C. jejuni* je citotoksični toksin (CDT), ki ga sestavljajo tri komponente. CdtA in CdtC obsegata vezavne komponente, CdtB pa je aktivna komponenta. Ko je holotoksin vezan na celico, se CdtB transportira v jedro, kjer inducira prelom dvojnovijačne DNA in zadrži celico v G2 fazi celičnega cikla. CDT *C. jejuni* inducira apoptozo makrofagov, predvidevajo pa tudi možno vlogo v imunosupresiji. Inducira tudi izločanje IL-8 iz epitelnih celic, kateri prispevajo k vnetni diareji (Poly in Guerry, 2008).

### 2.5 EPIDEMIOLOGIJA

V Severni Ameriki, Evropi in Japonski je kampilobakteroza ena od vodilnih bakterijskih bolezni, ki se prenašajo s hrano. Poraba okuženega perutninskega mesa ter stranskih proizvodov je predvidoma glavni vzrok bolezni.

Znani dejavniki tveganja za bolezen vključujejo uživanje premalo toplotno obdelanega mesa, okuženo hrano ali vodo, surovo mleko, neposreden stik s hišnimi ljubljenci, domačimi živalmi, kopanje v jezerih in potovanje v tujino (Ekdahl in sod., 2005).

Kampilobaktri se ne razmnožujejo v hrani, vendar pomnoževanje ni potrebno, saj je potreben le majhen odmerek, da povzroči okužbo (Hansson, 2007). V dveh eksperimentalnih okužbah pri ljudeh je *C. jejuni* povzročil bolezen pri peroralnem odmerku 500 CFU (Robinson, 1981) in 800 CFU (Black in sod., 1988).

V zmernih podnebnih območjih ima kampilobakterioza različen epidemiološki vzorec glede na letni čas z visoko pojavnostjo v poletnih mesecih (Nylen in sod., 2002). Opredeljeni dejavniki tveganja za okužbe s kampilobaktri lahko sovpadajo s poletnim vrhuncem zaradi neposrednih stikov živali, jedi na žaru, kopanja v jezerih, neobdelane pitne vode ter vode iz potokov in drugih naravnih virov (Schönberg-Norio in sod., 2004). Vendar vsi ti dejavniki lahko razložijo največ 50 % občasnih primerov (Nylen in sod., 2002). Epidemiologija kampilobakterioze je še vedno zelo nejasna, zato so se tudi razvile hipoteze, da so hišne muhe lahko pomembni mehanski vektorji te bolezni (Ekdahl in sod., 2005).

## 2.6 REZERVOAR BAKTERIJ RODU *Campylobacter* V ŽIVILIH

### 2.6.1 Perutnina

Ptice se zdijo, da so glavni rezervoar za termofilne kampilobakte, verjetno zaradi njihove visoke telesne temperature (Hansson, 2007). Kolonizacija črevesja v brojlerjih piščancev je zelo redka pred 7 dnevom starosti le teh. Ko so enkrat kolonizirani, piščanci normalno ostanejo asimptomatski nosilci, dokler ne dosežejo starosti, primerne za zakol (Gibbens in sod., 2001). Piščanci, kolonizirani s kampilobaktri, izločajo velike količine bakterij, običajno do  $10^8$  CFU/g blata (Altmeyer in sod., 1985; Stern in sod., 1995).

Pojavila so se poročila o sposobnosti kampilobaktrov za okužbo zaporednih generacij ali z neposrednim vertikalnim prenosom s kokoši na piščance preko jajc, ali s horizontalnim prenosom znotraj valilnice (Nesbit in sod., 2001; Petersen in sod., 2001). Uporaba kontaminirane vode za pitje v perutninskih farmah je bila ravno tako prepoznana kot pomemben dejavnik tveganja za kolonizacijo s kampilobaktri in je mogoče podcenjena zaradi obstoja negojljivih oblik (Newell, 2002).

Zanimivo je, da jajca niso pomemben vir kampilobaktrov. Študije, kjer so bila jajca iz jat koloniziranih s *C. jejuni*, so našli organizem na približno 1 % jajčnih lupin, in sicer na notranji strani lupine in membrani. Dolgotrajno preživetje na površinah suhih jajc je malo verjetno, jajčni albumin pa je močno bakteriociden.

### 2.6.2 Ostala živila

Prebavni trakt klinično normalnega goveda je pomemben rezervoar številnih kampilobaktrov (Minihan in sod., 2004). Trupi svinj so bolj pogosto kontaminirani kot govedo ali ovce (Nesbakken in sod., 2003). To je najverjetneje posledica dejstva, da prašičje trupe poparijo v zgodnji fazi postopka zakola in da koža ostane na trupu po vseh postopkih (Moore in sod., 2005).

Druga živila, ki so možni viri okužb s kampilobaktri, so školjke, gobe in zelenjava (Hussain in sod., 2007).

### 2.6.3 Mleko

Mleko lahko vsebuje kampilobaktrre, in sicer kot posledico fekalne kontaminacije na kmetiji ali morda kampilobakter mastitisa. Bakterije ne morejo preživeti pravih postopkov pasterizacije. Večina zabeleženih izbruhov, ki so bili precej veliki, so bili posledica uživanja nepasteriziranega mleka.

Post-pasterizacijska kontaminacija lahko vedno uvede mikroorganizem v toplotno že obdelano živilo. Mlečni izdelki, razen svežega mleka, ne predstavljajo nevarnosti, zaradi nizke odpornosti kampilobaktrov na pogoje znižane vrednosti pH ali  $a_w$  (Adams in Moss, 2008).

### 2.6.4 Pitna voda

Izbruhi, povezani s kontaminacijo pitne vode s *C. jejuni*, so predvsem skupni nordijskim državam, in sicer Švedski, Norveški in Finski, kjer v redko poseljenih območjih za podzemne vode ne uporabljajo dezinfekcije (Moore in sod., 2005).

### 2.6.5 Ukrepi

Potreben je nadzor in zmanjšanje fekalnih onesnaženj med prevozom živali, zakolom in obdelavo trupov (Whyte in sod., 2001). Da bi zmanjšali raven tega enteropatogena na trupih živali, v ZDA uporabljajo tudi radiacijo, prav tako je zelo redka kemična dekontaminacija, parna pasterizacija in vroča kopel (Whyte in sod., 2003). Obenem pa se morajo potrošniki in kuharji zavedati vloge, ki jo imajo pri zmanjševanju pojavnosti kampilobaktrov s preprečevanjem navzkrižne kontaminacije v kuhinjah in pri pripravi hrane (Humphrey, 2007). Med pripravo hrane je kontaminacija površin, kot so rezalni noži in plošče, hrana, pripravljena za uživanje, ki vsebuje surove in kuhane sestavine ter slabo umite roke, najbolj pomemben izvor navzkrižne kontaminacije (De Boer in Hahne, 1990).

## 2.7 ODPORNOST PROTI PROTIMIKROBNIM SNOVEM

Odpornost proti protimikrobnim snovem narašča za klinično pomembna zdravila, ki se uporabljajo za zdravljenje ljudi in živali (posebno fluorokinoloni). Dokazano je, da bolniki, okuženi s sevi, odpornimi na antibiotike, trpijo zaradi hujših posledic (invazivne bolezni), kot tisti, okuženi z občutljivejšimi sevi (Helms in sod., 2005). To poudarja potrebo po omejitvi uporabe protimikrobnih zdravil v veterinarski in humani klinični praksi za omejitev pojava odpornosti (Humphrey in sod., 2007).



## 2.8 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA

Analiza varnosti in kakovosti hrane potrebuje hitre, občutljive, natančne metode s ponovljivimi rezultati za dokazovanje in identifikacijo prisotnosti mikroorganizmov. Z molekularnimi metodami lahko neposredno iz kužnine potrdimo prisotnost patogena in ni potrebna izolacija na selekcijskih gojiščih. Kljub temu pa so danes standardne kultivacijske metode še vedno nujna podpora molekularnim metodam za določitev prisotnosti mikroorganizmov v različnih vzorcih, vključno s hrano in vodo.

### 2.8.1 Klasična gojitvena metoda

Analiza *Campylobacter* spp. se običajno izvaja z neposredno inokulacijo na selektivna gojišča ali z obogatitvijo, kateri sledi gojenje na trdnih gojiščih. Obogatitev je nujna potreba, če so bakterije prisotne v majhnih koncentracijah ali so bile poškodovane zaradi okoljskih stresov, kot so temperaturne spremembe, primanjčevanje hranil, dehidracija ali izpostavljenost atmosferskemu kisiku (Corry in sod. 1995).

V primerih vzorcev hrane in okoljske vode, kjer je število celic zelo majhno v primerjavi z visokim številom ostale konkurenčne mikrobiote, je obogatitvena kultura v gojišču obvezna, saj si tako celice opomorejo pred nanosom na selektivno gojišče. Za obogatitev se zlasti uporabljajo gojišča Exeter, Bolton, Preston, CEB (*Campylobacter* Enrichment Broth) in Park-Sanders.

Ključni korak za izolacijo kampilobaktrov je razvoj selektivnega gojišča, ki se je začel že v 1970-ih letih in se še nadaljuje danes. Selektivnost gojišča je zagotovljena s vključenostjo antibiotikov. Cefalosporini so pogosto uporabljeni v kombinaciji z drugimi antibiotiki, kot je trimetoprim, vankomicin, amfotericin in rifampicin, saj je večina kampilobaktrov odpornih na te antibiotike. Glavna razlika med temi gojišči je v količini in vrsti antibiotikov za inhibicijo ostale mikrobiote. Gojišča prihajajo iz dveh glavnih skupin: tista ki vsebujejo kri, in tista, ki vsebujejo oglje. Najpogosteje uporabljena selektivna gojišča s krvnimi komponentami so agar Skirrow (Skirrow, 1977), agar Preston (Bolton in Robertson, 1982), medtem ko so selektivna gojišča z ogljem agar CAT (Aspinall in sod., 1993), mCCDA (Hutchinson in Bolton, 1984) in agar Karmali (Karmali in sod., 1986).

Jasson in sod. (2009) so primerjali selektivnost gojišča Preston in Bolton ter ugotovili, da je v čisti kulturi gojišče Bolton omogočilo hitrejšo rast *C. jejuni* v primerjavi z gojiščem Preston. Prav tako si je v gojišču Bolton opomoglo veliko več celic, kar se je tudi pokazalo v nižjih vrednostih Ct. V primeru mešane kulture, ki je vsebovala kampilobakte in *E. coli*, ki izločajo beta laktamaze razširjenega spektra (ESBL), so le-te prevladovale v gojišču Bolton in na ploščah mCCDA. V nasprotju pa gojišče Preston ni podprlo rasti ESBL, vendar je pokazalo daljši čas detekcije *C. jejuni* v primerjavi z gojiščem Bolton. Študija je pokazala, da so *E. coli* izolirane iz izpirkov odporne na vsaj 4 antibiotike in vplivajo na odkrivanje kampilobaktrov

zaradi njihove rezistence na natrijev cefoperazon, uporabljen v gojišču Bolton in na ploščah mCCDA. Zato je lahko uporaba istega antibiotika v gojišču in selektivnem gojišču kritična (Jasson in sod., 2009).

Komponente krvi in oglja odstranjujejo strupene kisikove derivate, kot so peroksidi, singletni kisika in superoksidni ioni, ki lahko nastanejo, ko so gojišča izpostavljena svetlobi. Ti produkti so strupeni za kampilobaktrije, ker ti nimajo aktivnih encimov superoksid dismutaze in peroksidaze (Corry in sod., 1995).

Kri v gojišču lahko vpliva na izolacijo kampilobaktrov, lahko pa tudi inhibira PCR reakcijo (Williams in sod., 2009). Uspešno je lahko tudi gojišče Bolton brez krvi in drugih dodatkov, kot so železov sulfat, natrijev metabisulfit, natrijev piruvat in hemin, ki ustvarjajo učinkovito zaščito proti toksičnim kisikovim derivatom (Paulsen in sod., 2005).

Izvedena je bila študija, v kateri so bili vzorci obogateni v gojišču Bolton, mBolton in mExeter z in brez dodatka defibrinirane konjske krvi. Po obogatitvi vzorcev učinek krvi ni bil zaznan. Predvidevajo, da se lahko to nanaša na različno sestavo populacije konkurenčnih bakterij, ki lahko ustvarijo nizke koncentracije kisika v ozračju ali zmanjšajo prisotnost strupenih spojin. Josefsen in sod. (2004) so prav tako izvedli študijo, v kateri so uporabili gojišče Bolton brez krvi in s krvjo za obogatitev načrtno kontaminiranih vzorcev. Njihov zaključek je bil, da sta obe metodi primerni za uporabo. Na splošno prisotnost krvi v gojiščih ni nujna, čeprav se izolacije lahko razlikujejo glede na vrsto vzorca in metode, uporabljene za obogatitev (Williams in sod., 2009).

Večina vrst optimalno rast doseže v atmosferi s 5-10 % kisika in 1-10 % ogljikovega dioksida (Bolton in Coates, 1983), rast nekaterih vrst pa se poveča s prisotnostjo vodika (Goodman in Hoffman, 1983). Na voljo je več metod za doseganje optimalne mešanice plinov, kot so komercialni pripravki Campygen (Oxoid Basingstoke UK) in Campypac (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) ali anaerobni lonci z ventili za odstranitev in polnjenje plina, na primer sistem Anoxomate (Anoxomate, Mart-Nizozemska).

Potrditev kampilobaktrov temelji predvsem na morfologiji kolonij, mikroskopskem videzu in naslednjih fenotipskih značilnosti: proizvodnja katalaze, hidroliza hipurata in indoksil acetata ter občutljivost na nalidiksično kislino in cefalotin (Nachamkin, 1995).

Preglednica 1: Prikaz biokemičnih lastnosti termofilnih kampilobaktrov (ISO 10272-1: 2006).

Karakteristika	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Katalaza	+	+	+	-
Nalidiksična kislina	S	S	R/S	S
Cefalotin	R	R	R	S
Hidroliza hipurata	+	-	-	-
Indoksil acetat	+	+	-	+

+ = pozitiven  
- = negativen  
S = občutljiv  
R = rezistenten

Identifikacijo ovirajo subjektivna razlaga biokemijskih testov in atipični fenotipi nekaterih sevov. Glavno razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* je sposobnost *C. jejuni*, da hidrolizira hipurat. Vendar se je izkazalo, da nekateri sevi *C. jejuni*, ki so bili pogosto izolirani prav iz piščančjega mesa, niso bili sposobni hidrolizirati hipurata, zaradi česar so bili v primeru fenotipske identifikacije sevov pogosti lažno negativni rezultati (Smole Možina in Uzunović-Kamberović, 2005).

#### 2.8.1.1 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu *Campylobacter* v vodi

Odkrivanje kampilobaktrov v okoljskih vodah vključuje začetno koncentracijo na membranskih filtrih, nato pa inkubacijo teh filtrov v obogatitvenem gojišču. Po mednarodnem standardu ISO 17995 prefiltriramo 100 ml vode skozi filter z 0,45  $\mu\text{m}$  porami. Nato položimo filter v gojišče Preston in inkubiramo v mikroaerofilni atmosferi pri  $37 \pm 1$  °C za  $44 \pm 4$  ure. Po inkubaciji odvzamemo 100  $\mu\text{l}$  vzorca iz obogatitvenega gojišča in ga razmažemo s stekleno palčko po plošči mCCDA. Plošče nato zapremo v anaerobne lonce, dodamo vrečke za vzpostavitev mikroaerofilne atmosfere in inkubiramo pri  $41,5 \pm 1$  °C za  $44 \pm 4$  ure. Nato precepimo tipične kolonije rodu *Campylobacter* na 2 plošči mCCDA. Eno ploščo mCCDA inkubiramo aerobno, drugo pa mikroaerofilno pri  $41,5 \pm 1$  °C za  $44 \pm 4$  ure. V kolikor je rast samo na plošči mCCDA, ki smo jo inkubirali mikroaerofilno, izvedemo biokemične teste, ki omogočajo potrditev in identifikacijo do posameznih vrst.

Abulreesh in sod. (2005) so se lotili raziskave, v kateri so odkrivali kampilobakte v 10, 100 in 1000 ml velikih vzorcih. Obogatitvene kulture iz 1000 ml filtratov so vsebovale višje število konkurenčne mikrobiote. Ugotovili so tudi, da je bilo skupno število bakterij v vzorcih, ki so bili negativni za kampilobakte, veliko večje, kot tam, kjer so bili vzorci pozitivni na kampilobakte. Kompetitivna mikrobiota torej preprečuje rast in kampilobaktri ne morejo zrasti do zaznavnih količin (Abulreesh in sod., 2005).

Izvedena je bila študija, v kateri so primerjali membransko filtracijo (MF) in centrifugacijsko metodo (CF). MF metoda je temeljila na ISO standardu, ki določa koncentracijo celic kampilobaktrov na podlagi 500 ml filtrirane vode, vključno s selektivno obogatitvijo in izolacijo na mCCDA. CF metoda pa je temeljila na podlagi centrifugiranja 1000 ml velikega vzorca. Izkazalo se je, da je bila centrifugacijska metoda bolj uspešna v smislu večjega števila odkritih pozitivnih vzorcev in večjega števila odkritih vrst *C. coli* in ostalih vrst kampilobaktrov. Ta študija je pokazala, da različne metode lahko dajo značilno različne rezultate. Potrebna je previdnost, kadar primerjamo študije, ki poročajo o pogostosti pojavljanja vodnih kampilobaktrov na nivoju rodu, saj uporabljajo različne metode (Khan in sod., 2009).

Nedavno je bila izvedena študija, kjer so celulozni filtri z 0,65  $\mu\text{m}$  velikimi porami dali večjo učinkovitost kot 0,45  $\mu\text{m}$  filtri. Filtri z 0,65  $\mu\text{m}$  porami naj bi obdržali manj celic. Prav tako so

ugotovili, da zelo suhe agarske plošče niso primerne za rast kampilobaktrov, kar se odrazi v nižji občutljivosti detekcije (Speegle in sod., 2009).

#### 2.8.1.2 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu *Campylobacter* v perutnini

Največja koncentracija kampilobaktrov je na površini perutninskega mesa, zato odkrivanje kampilobaktrov v perutnini temelji na izpirku. V laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo na ZZV Maribor uporabljajo 180 ml fiziološke vode za izpirek, vendar samo 25 ml za nadaljnjo detekcijo in identifikacijo kampilobaktrov. Po mednarodnem ISO standardu 10272-1 se 25 ml izpirka doda h gojišču Bolton ali Preston, čemur sledi inkubacija v mikroaerofilni atmosferi pri  $41,5 \pm 1$  °C za  $44 \pm 4$  ure. Vsi nadaljnji postopki za odkrivanje prisotnosti kampilobaktrov se ne razlikujejo od postopkov, opisanih v prejšnji točki.

#### 2.8.1.3 Klasični postopek odkrivanja prisotnosti bakterij rodu *Campylobacter* v mesnih pripravkih

Po mednarodnem ISO standardu 10272-1 za vzorce živil uporabimo 25 gramov vzorca, ki ga inkubiramo v gojišču Preston ali Bolton. Inkubacija in identifikacija poteka enako kot pri postopku odkrivanja kampilobaktrov v perutnini.

Visoka slanost, nizek pH in različne začimbe inhibirajo rast bakterij, vendar ni nujno, da uničijo vse prisotne celice, zato jih lahko najdemo tudi v npr. mariniranih izdelkih.

Trenutno ne poznamo najbolj ustrezne velikosti vzorcev za izolacijo kampilobaktrov, zato so Oyarzabal in sod. (2007) preučevali, če je razmerje obogatitve 1:4 enako uspešno kot razmerje 1:9. V svojo raziskavo so vključili puferizirano peptonsko vodo z dodatki krvi in antibiotikov, ki naj bi bila skoraj tako učinkovita kot gojišče Bolton. Raziskava je pokazala, da je izolacija kampilobaktrov iz vzorcev perutnine v obogatitvenem razmerju 1:4 bolj učinkovita od razmerja 1:9.

Ker je termofilne kampilobaktre v nekaterih vzorcih zelo težko odkriti, so se razvile tudi druge metode za izolacijo in identifikacijo, na primer membranska filtracija (Steele in McDermott, 1984), imunohistokemija (Endtz in sod., 2000) in številni postopki na osnovi reakcije PCR (Lund in sod., 2004).

## 2.8.2 Molekularne metode

Mikroorganizmi so preživel, se razvili in razširili v človeški populaciji. Živimo v času preporoda v odkrivanju novih mikroorganizmov, ki so bili prej neznan, čeprav so verjetno živeli skupaj z nami zelo dolgo časa. Zaradi tega je stalna potreba po laboratorijskih metodah, ki so hitre, enostavne in učinkovite za odkrivanje teh drobnih organizmov. PCR je ena od teh metod, ki je hitro našla svojo mesto v obeh, kliničnem in raziskovalnem mikrobiološkem laboratoriju in je od leta 1984 zelo napredovala. Danes jo uporabljamo v mnogih izpeljankah (Deepak in sod., 2007).

Verižna reakcija s polimerazo oz. PCR je najpomembnejša pri odkrivanju polimerov nukleinskih kislin, tako deoksiribonukleotidnih kot ribonukleotidnih. Ime verižna reakcija s polimerazo izhaja iz DNA polimeraze, ki se uporablja za pomnožitev odsekov DNA z *in vitro* encimskim pomnoževanjem. Originalna molekula oz. molekule DNA se pomnožujejo z DNA polimeraznim encimom, s čimer se podvoji število DNA molekul. Vsaka od teh molekul se pomnoži tudi v drugem "ciklu" pomnoževanja, s čimer pridobimo kar štirikratno število izvorne molekule. Ponovno se vsaka od teh molekul pomnoži v tretjem krogu pomnoževanja itd. Ta proces je znan kot "verižna reakcija", v katerih se izvorna matična DNA eksponentno pomnožuje. S PCR je mogoče razširiti eno samo DNA, ali zelo majhno število kosov DNA čez več ciklov, ki ustvarjajo milijone kopij izvorne molekule DNA.

Metodo PCR povzamemo v treh korakih, in sicer:

- ločitev dvojnovijačne DNA pri temperaturi 95 °C (denaturacija);
- vezava oziroma prileganje začetnih oligonukleotidov, običajno pri temperaturi med 50 in 60 °C;
- pomnoževanje odsekov DNA med začetnima oligonukleotidoma pri 70 do 75 °C (Espy in sod., 2006).

PCR se izvaja v epruvetkah z mešanico DNA, oligonukleotidi, Taq polimerazo (vrste *Thermus aquaticus*, ki prenese zelo visoke temperature), prostimi nukleotidi (dNTP za DNA in NTP za RNA) in pufri. Ko je reakcija končana, pomnožke reakcije analiziramo z gelsko elektroforezo, vendar pri prenosu le-teh na gel obstaja možnost kontaminacije. PCR v realnem času ima zato veliko prednost, saj omogoča analizo produktov v zaprtem sistemu (PCR aparatu), medtem ko je reakcija dejansko še v teku. To dosežemo z uporabo različnih fluorescentnih barvil, ki reagirajo s pomnoženimi produkti in jih kvantitativno merimo s PCR aparatom.

### 2.8.2.1 PCR v realnem času

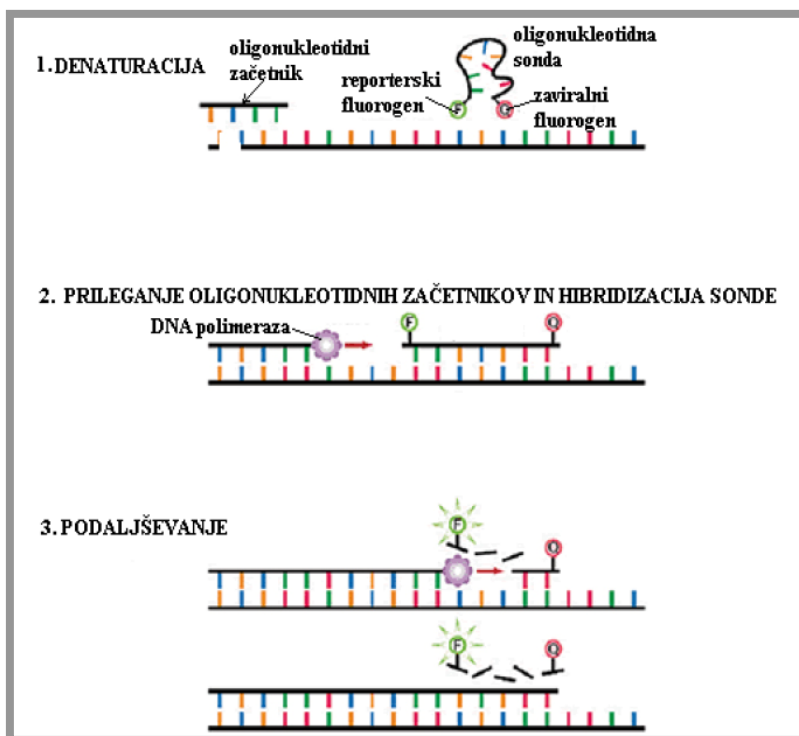
PCR v realnem času je pomembno vplival na napredek v laboratorijski mikrobiološki diagnostiki (Espy in sod., 2006). Tako je omogočil hkratno detekcijo in kvantifikacijo pomnoženega produkta s fluorescentnim označevalcem. V današnjem času se uporabljajo 3 vrste fluorescentnih označevalcev: TaqMan označevalci, molekularni oddajniki (ang.

molecular beacons) in hibridizacijski označevalci, ki delujejo na principu prenosa energije med fluoroforjema (Uhl in Cockerill, 2004).

### 2.8.2.1.1 TaqMan označevalec

Na ZZV Maribor uporabljajo za detekcijo kampilobaktrov TaqMan označevalec, kjer sta obe barvili vezani na en označevalec. Uporabljajo se specifični začetni oligonukleotidi in sonde, označene s fluorescentnimi barvili. Kratko zaporedje DNA ima na 5' - koncu vezano fluorescentno barvilo FAM (angl. reporter; ponavadi kratke valovne dolžine) in na 3' - koncu istega oligopeptida zaviralec fluorescence TAMRA (angl. quencher; ponavadi dolge valovne dožine).

Ob pomnoževanju specifičnih odsekov DNA sonda hibridizira s homolognim zaporedjem, zatem pa jo Taq polimeraza ob podaljšanju nukleotidne verige zaradi 5-eksonukleazne aktivnosti razgradi. Zaradi tega se barvili ločeno sprostita v raztopino in aparat zazna sevanje reporterskega barvila. V primeru, da je sonda v raztopini prosta, detektor sevanje reporterja ne zazna. Po določenem številu pomnoženih ciklov izmerjeni signal, ki ga oddaja reporter, preseže vrednost praga. Ciklu, v katerem signal preseže vrednost praga, imenujemo prazni cikel, označimo pa ga kot vrednost Ct.



Slika 4: Grafični prikaz poteka PCR v realnem času z označevalcem TaqMan (BIOMMED, 2010).

Meja občutljivosti je najmanjše število oz. koncentracija mikrobov, ki jo še lahko zaznamo z izbrano metodo. Metoda PCR naj bi imela nizko mejo občutljivosti. Mednarodni standardi, ki izhajajo iz tradicionalnih metod, zahtevajo odkritje ene celive v 25 g vzorca. Toda v praksi veliko snovi reagira kot zaviralci DNA polimeraze, s čimer se zmanjšujejo praktične možnosti odkrivanja bakterij na osnovi reakcije PCR.

Izvedena je bila študija, kjer so primerjali občutljivost posamezne metode in ugotovili, da je meja zaznavnosti obogatitvene kultivacijske metode in PCR po obogatitvi manj kot 1 CFU/ml. Meja zaznavnosti pri direktni kultivaciji pa je bila 70 cfu/ml, direktnega PCR pa 700 CFU/ml. (Katzav in sod., 2008). Druga raziskava pa je pokazala večjo občutljivost PCR metode, in sicer je bilo pozitivnih vzorcev za kampilobakte s kultivacijsko metodo 9,3 % in s PCR metodo 12,4 %. Skladnih rezultatov je bilo 96,4 %. En rezultat je bil negativen s PCR metodo, toda pozitiven s kultivacijsko metodo. Ta napačno negativen rezultat je predvidoma posledica dejstva, da je vzorec za preiskavo s kultivacijsko metodo veliko večji, kot za metodo PCR (25 ml obogatene v 225 ml gojišča Bolton v primerjavi z 1 ml).

Vzrok za navidezno večjo občutljivost PCR je lahko tudi detekcija mrtvih in negojljivih celic. Zaradi pomanjkanja hrane in stresa lahko *C. jejuni* preide v negojljivo stanje. To daje odgovor na nezmožnost kultivacijskih tehnik pri izolaciji organizmov. Število prisotnih *C. jejuni* lahko upade hitreje pri višjih temperaturah ali pri zamrznjenem vzorcu. V primeru vode pa je obstojnost odvisna tudi od sončne svetlobe. Te mrtve celice ne predstavljajo rizika za zdravje ljudi, ampak nam povedo, da je bila voda predčasno kontaminirana s *C. jejuni*. Yang in sod. (2003) so pokazali, da so vsi vzorci, ki so dali pozitiven rezultat s kultivacijsko metodo, bili pozitivni tudi s PCR v realnem času. Tisti vzorci, ki so bili pozitivni samo s PCR v realnem času, pa so verjetno vsebovali DNA mrtvih ali negojljivih celic. Rezultati so tudi pokazali, da je TaqMan sonda primerna za uporabo v napravi Light-Cycler za identifikacijo *C. jejuni* s PCR v realnem času.

Selektivnost je glavno merilo za opredelitev PCR testa kot orodja za hitro in učinkovito odkrivanje bakterij *C. jejuni*, *C. coli* in *C. lari* v vzorcih živil. Tako so se leta 2003 Lübeck in sodelavci lotili raziskave, v kateri so razvili metodo PCR, ki je temeljila na odkrivanju predvidoma selektivnega odseka gena 16S rRNA. Primerjali so petnajst različnih začetnih oligonukleotidov, ki so se prilegali različnim odsekom 16S rRNA gena in dva začetna oligonukleotida, ki sta se prilegala odsekoma 23s rRNA gena. Samo en par se je izkazal za selektivnega, in sicer začetni oligonukleotid OT1559 v kombinaciji z 18-1 začetnim oligonukleotidom (Lübeck in sod., 2003).

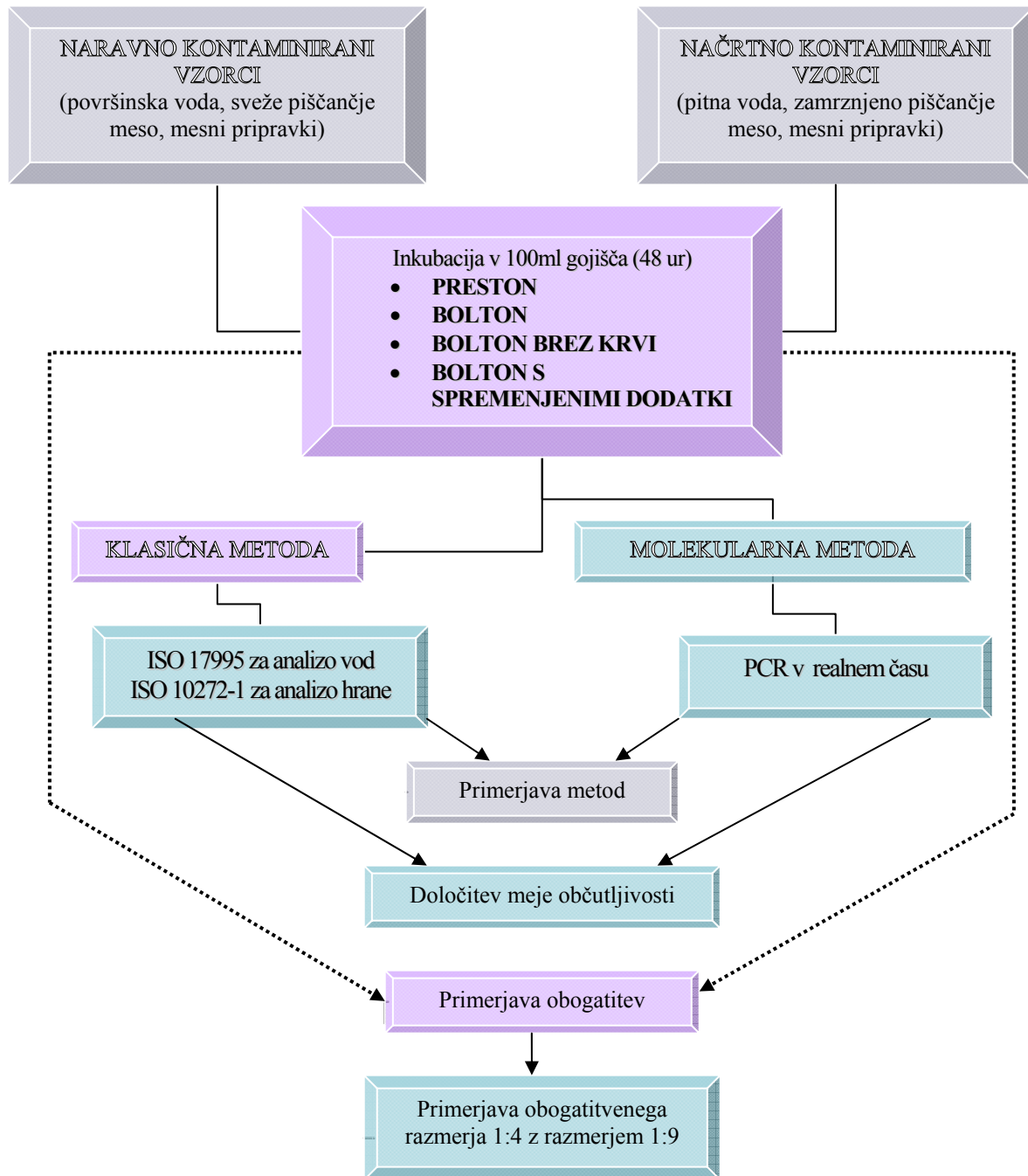
PCR v realnem času je najbolj specifična, občutljiva in ponovljiva metoda, vendar ima poleg relativno drage opreme in reagentov tudi druge pomanjkljivosti v primerjavi s klasično gojitveno tehniko. To velja predvsem pri uporabi vzorcev z zelo majhno ravniyo bakterij, kot je to v okoljski vodi. Lažno negativni rezultati so lahko posledica uporabe majhnih količin in prisotnost PCR inhibitorjev. Napačno pozitivni rezultati pa so lahko posledica odmrlih celic ali proste DNA. Da bi se izognili tem pomanjkljivostim in izkoristili najboljše lastnosti teh

dveh metod, je najbolje uporabiti kombinacijo PCR in klasične gojitvene metode, kar smo upoštevali tudi v naši raziskovalni nalogi.



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema poskusa

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Vzorci živil

V raziskavo smo vključili naslednje tipe vzorcev: površinsko vodo (n = 31), pitno vodo (n = 3), perutninsko meso (n = 10), zamrznjeno perutninsko meso (n = 13) in mesne pripravke (n = 11). Nekateri vzorci površinskih vod, perutninskega mesa in mesnih pripravkov, ki smo jih preučevali, so bili vključeni v izbor merilnih mest monitoringa za leto 2009 (Državni monitoring za kakovost površinskih voda in monitoring zoonoz). Preostale vzorce pa smo pridobili z vzorčenjem na določenih odvzemnih mestih z izvedbo notranjega nadzora, ki ga opravlja ZZV Maribor.

Vzorke pitne vode smo odvzeli na ZZV Maribor v skladu s predpisi o odvzemu vzorcev. Vzorci zamrznjenega piščančjega mesa pa so že bili predhodno analizirani na ZZV Maribor s klasično metodo in bili daljše obdobje (3 do 6 mesecev) zamrznjeni pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na podlagi arhiviranih izvidov smo pridobili informacije o analiziranem vzorcu (ali je pozitiven/negativen na kampilobakte).

### 3.2.2 Mikroorganizmi

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili dva referenčna seva, izolirana iz vzorcev perutnine in površinskih vod.

- ✧ *C. jejuni* ATCC 33291
- ✧ *C. coli* ATCC 43477

### 3.2.3 Gojišča

Za obogatitev bakterij rodu *Campylobacter* smo uporabljali 4 različna obogatitvena tekoča gojišča, in sicer gojišče Preston, Bolton, Bolton brez krvi in Bolton s spremenjenimi dodatki.

#### 3.2.3.1 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston

- 25 g osnovnega hranilnega gojišča št. 2 (Oxoid CM0067)
- 50 ml defibrinirane konjske krvi (Oxoid SR0048)
- Dodatek za rast (ISO 17995:2005(E))
- Dodatek za selektivnost (ISO 17995:2005(E))

Preglednica 2: Sestavine dodatka za rast v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E)).

Sestavine	Količina (g/l)
Natrijev piruvat	0,25
Natrijev metabisulfit	0,25
Železov sulfat FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25

Preglednica 3: Sestavine dodatka za selektivnost v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E)).

Sestavine	Količina
Polimiksin B	5000 IU
Rifampicin	10,0 mg
Trimetoprim	10,0 mg
Amfotericin B	10,0 mg

#### Priprava tekočega gojišča Preston

12,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH<sub>2</sub>O in sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali 25 ml defibrinirane konjske krvi ter po eno stekleničko dodatka za rast in dodatka za selektivnost.

#### 3.2.3.2 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton

- Osnovni medij za gojišče Bolton (Oxoid CM0983)
- Dodatek za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid SR0183)
- Defibrinirana konjska kri (Oxoid SR0048)

Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton (Oxoid CM0983).

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni pepton	10,0
Laktalbumin hidrolizat	5,0
Kvasni ekstrakt	5,0
Natrijev klorid	5,0
Natrijev piruvat	0,5
Natrijev metabisulfit	0,5
Natrijev karbonat	0,6
Alfa-ketoglutarat	1,0
Hemin	0,01
pH 7,4 ± 0,2	

Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid SR0183).

Sestavine	Količina (mg/l)
Cefoperazon	20,0
Vankomicin	20,0
Trimetoprim	20,0
Cikloheksamid	50,0

#### Priprava tekočega gojišča Bolton

13,8 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH<sub>2</sub>O in sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121° C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C smo aseptično dodali 25 ml defibrinirane konjske krvi in eno stekleničko dodatka za selektivnost.

#### 3.2.3.3 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton brez krvi

- Osnovni medij za gojišče Bolton (Oxoid CM0983)
- Dodatek za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid SR0183)

#### 3.2.3.4 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton s spremenjenimi dodatki za selektivnost

- Osnovni medij za gojišče Bolton (Oxoid CM0983)
- Defibrinirana konjska kri (Oxoid SR0048)
- Dodatek za selektivnost CAT – cefoperazon, amfotericin B, teikoplanin (Oxoid SR0174)

Preglednica 6: Sestava dodatka za selektivnost v Boltonu + CAT (Oxoid SR0174).

Sestavine	Količina (g/l)
Cefoperazon	16,0
Teikoplanin	8,0
Amfotericin B	20,0

#### 3.2.3.5 Trdno selektivno gojišče mCCDA (modificirani ogljeni cefoperazon deoksiholatni agar)

- Osnovni medij CCDA (Oxoid CM0739)
- Destilirana voda
- Dodatek za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid SR0155)

Preglednica 7: Sestava osnovnega medija CCDA (Oxoid CM0739).

Sestavine	Količine (g/l)
Nutrient Broth No.2	25,0
Aktivno oglje	4,0
Kazein hidrolizat	3,0
Natrijev dezoksikolat	1,0
Železov sulfat	0,25
Natrijev piruvat	0,25
Agar	12,0
pH 7,4 ± 0,2	

Preglednica 8: Sestava dodatka za selektivnost CCDA (Oxoid SR0155).

Sestavine	Količina (mg/l)
Cefoperazon	32
Amfotericin B	10

### Priprava trdnega gojišča mCCDA

22,75 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH<sub>2</sub>O in sterilizirali pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali dodatek za selektivnost. Dobro smo premešali in prelili v sterilne petrijevke.

#### 3.2.3.6 Trdno gojišče Mueller Hinton

- Osnovni medij
- 50 ml sterilne defibrinirane ovčje krvi

Preglednica 9: Sestava osnovnega medija Mueller Hinton.

Sestavine	Količina (g/l)
Prebavni encimi iz živalskih tkiv	6,0
Prebavni encimi kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

### Priprava trdnega gojišča Mueller Hinton

21 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH<sub>2</sub>O in sterilizirali pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali 25 ml defibrinirane ovčje krvi. Dobro smo premešali in prelili v sterilne petrijevke.

#### 3.2.4 Reagenti in raztopine

##### 3.2.4.1 Detekcija hidrolize indoksil acetata

- Raztopina indoksil acetata
- Aceton
- Sterilna voda

Diske indoksil acetata smo inokulirali s kolonijo ter prelili s kapljico sterilne destilirane vode. Rezultat smo ovrednotili kot pozitiven v primeru temno modre obarvanosti v roku 5-10 minut.

### 3.2.4.2 Detekcija hidrolize hipurata

- Natrijev hipurat
- Natrijev klorid
- Dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
- Voda
- Ninhidrin

Kolonijo smo inokulirali v 0,4 ml raztopine natrijevega hipurata. Dobro smo premešali in inkubirali 2 uri v vodni kopeli pri 37 °C. Nato smo na vrh raztopine dodali 0,2 ml ninhidrina in inkubirali 10 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Pozitiven rezultat smo odčitali v primeru temno vijolične obarvanosti.

### 3.2.4.3 Detekcija občutljivosti na nalidiksično kislino in cefalotin

- Fiziološka raztopina
- Disk nalidiksične kisline in cefalotina

Sterilno fiziološko raztopino (2 ml) smo inokulirali s kolonijo ter pripravili suspenzijo z gostoto 0,5 enote po McFarlandu. Agar Mueller Hinton smo nato inokulirali s pripravljeno suspenzijo ter dodali diske nalidiksične kisline in cefalotina. Inkubirali smo pri 37 °C za  $22 \pm 2$  uri v mikroaerofilni atmosferi.

### 3.2.4.4 Reagenti za izolacijo DNA s setom QIAamp Mini Kit

- ✧ Puffer ATL
- ✧ Proteinaza K
- ✧ Puffer AL
- ✧ Etanol (96 – 100 %)
- ✧ Puffer AW1
- ✧ Puffer AW2
- ✧ Puffer AE

### 3.2.4.5 Reagenti za pripravo mešanice PCR

- ✧ Sonda 16S
- ✧ Pufer BSA
- ✧ Specifična začetna oligonukleotida za bakterije rodu *Campylobacter* (Josefsen in sod., 2004) :
  - Oligonukleotidni začetnik F (angl. Forward 18-1):  
5' CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG 3',
  - Oligonukleotidni začetnik R (angl. Reverse OT-1559):  
5' TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA 3'.
- ✧ Taqman reakcijska mešanica za verižno reakcijo s polimerazo
- ✧ Voda PCR

### 3.2.5 Laboratorijski pribor in oprema

Pri delu smo uporabljali naslednji pribor in opremo:

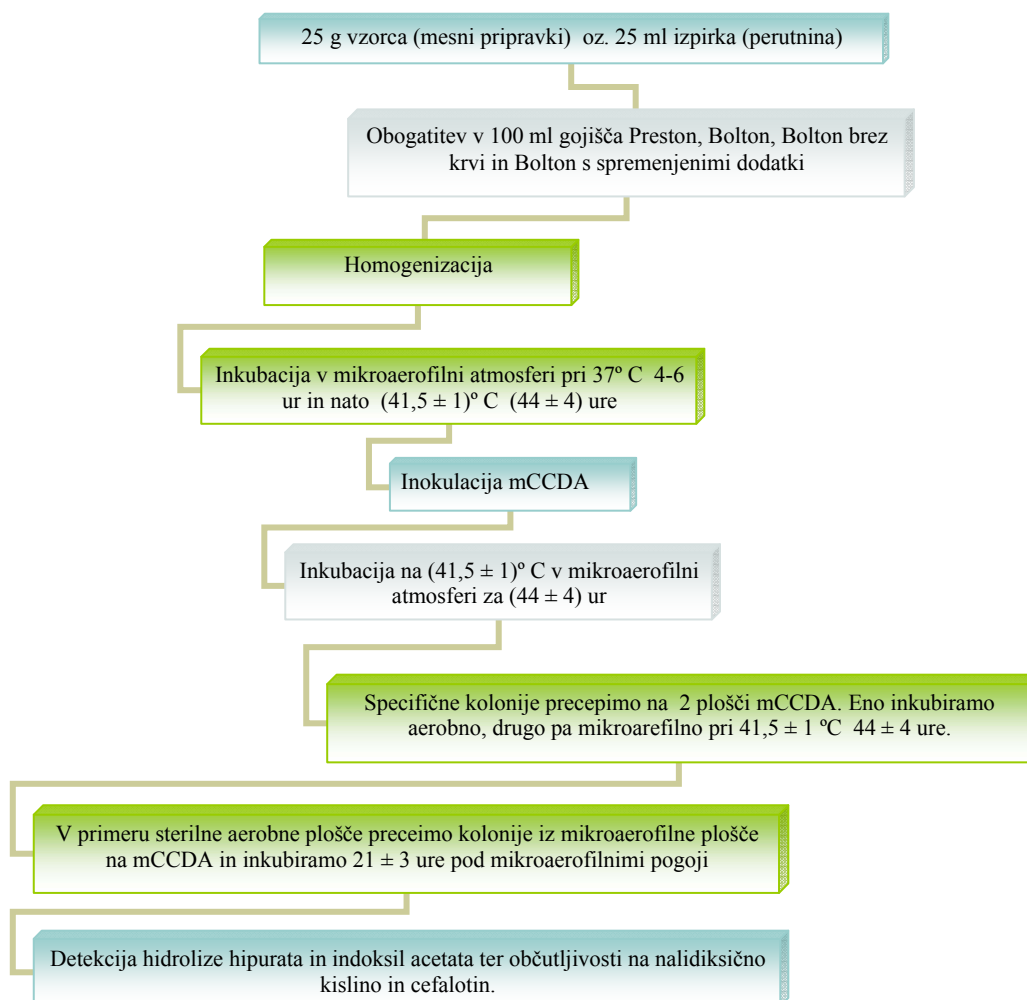
- halja
- rokavice
- cepilne zanke
- spatula po Drigalskem
- mikrocentrifugirke (1,5ml in 2 ml)
- petrijeve plošče
- skalpeli
- merilni valji (50 ml in 100 ml)
- pincete
- steklene epruvete
- mikroaerofilne vrečke (CampyGen; Oxoid, Velika Britanija)
- plinski gorilnik
- vrtinčni mešalnik (Assistant Reamix 2789, Nemčija)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- steklene Pateurjeve pipete (10 ml)
- stresalna vodna kopel (Eppendorf, Nemčija)
- mikrobiološka komora – laminarij (Iskra PIO, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- zamrzovalnik (Kirsch, Nemčija)
- kalibrirana tehtnica (AES Laboratories, Nemčija)
- inkubator (WTB binder, Nemčija)
- anaerobni lonec
- centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- nefelometer Densimat (Biomerieux, Francija)
- LightCycler (Roche, Švica)



### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v perutninskem mesu in mesnih pripravkih s klasično metodo (ISO 10272-1)

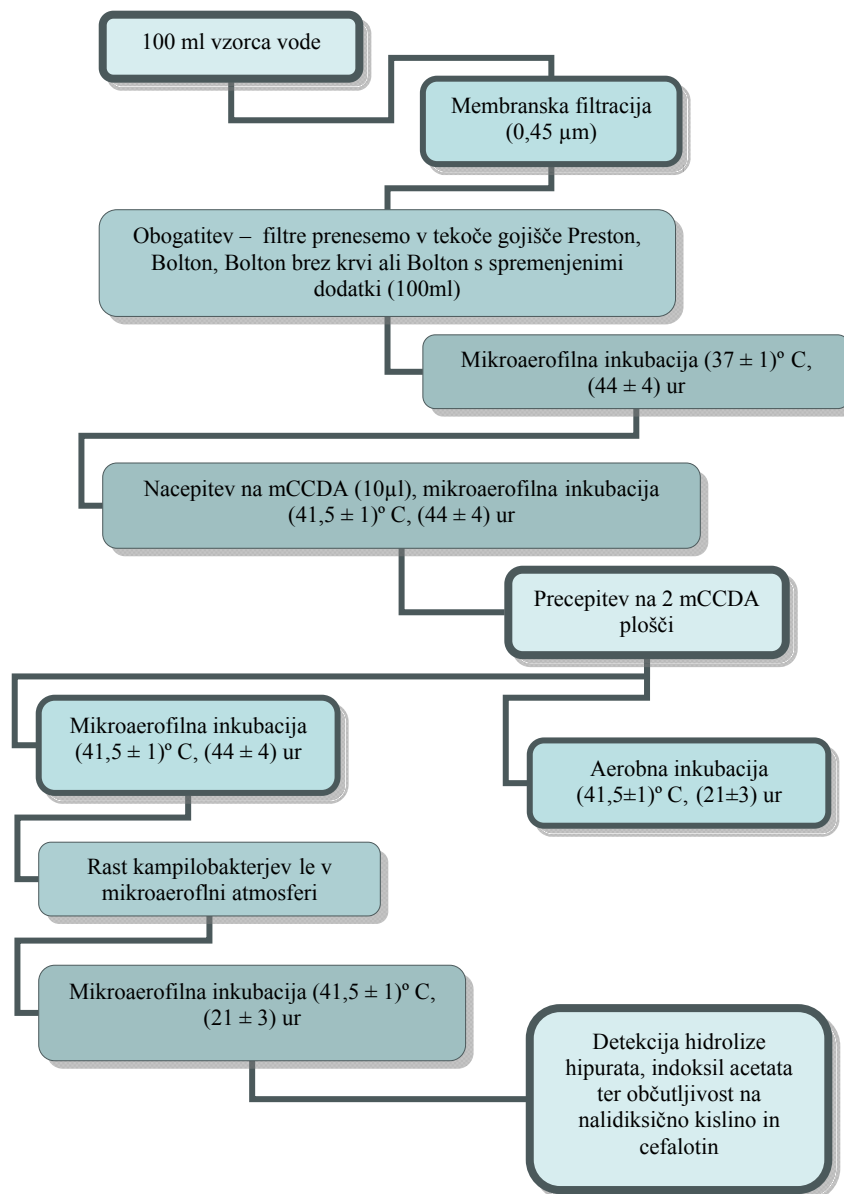
V rutinskih diagnostičnih laboratorijih poteka odkrivanje in identifikacija kampilobaktrov v živilih po mednarodnem standardu, kar omogoča primerljivost, ponovljivost in sledljivost rezultatov. V živilih je število kampilobaktrov pogosto majhno, v primerjavi s kompetitivno mikrobioto. Zato je potrebna obogatitev v gojišču Bolton v razmerju 1:9, kot navaja standard ISO 10272-1. Naš postopek je bil enak kot po standardu ISO, le da smo uporabili še dodatna obogatitvena gojišča in vključili obogatitveno razmerje 1:4.



Slika 6: Potek določanja kampilobaktrov v perutninskem mesu in mesnih pripravkih s klasično metodo.

### 3.3.2 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi s klasično metodo (ISO 17995).

Tudi pri odkrivanju kampilobaktrov v vzorcih vod je potrebna obogatitev, saj so kampilobaktri v vodi velikokrat izpostavljeni pogojem, ki nanje delujejo stresno. V tem postopku smo ravno tako uporabili dodatno obogatitveno razmerje 1:4 in dodatna obogatitvena gojišča, kot jih navaja standard ISO 17995.



Slika 7: Potek določanja kampilobaktrov v vodi s klasično metodo.

### 3.3.3 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi, perutninskem mesu in mesnih pripravkih z molekularnimi metodami

Po 48-urni inkubaciji vzorcev v obogatitvenih gojiščih smo iz vsake obogatitve odpipetirali 1 ml vzorca v mikrocentrifugirke. Vzorce smo centrifugirali 10 minut pri 10.000 rpm. Nato smo supernatant odpipetirali ter usedlino shranili pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v kolikor ni bila mogoča takojšnja izolacija.

#### 3.3.3.1 Izolacija DNA s setom QIAamp Mini Kit

Uporabili smo postopek, ki ga priporoča proizvajalec:

- Vzorce smo centrifugirali na kratko pri 10.000 rpm.
- Usedlini smo dodali 180  $\mu\text{l}$  ATL pufra in 20  $\mu\text{l}$  proteinaze K ter premešali z vrtinčnim mešalnikom 15 s. Pripravili smo tudi kontrolno okolje, v katero smo dodali 200  $\mu\text{l}$  PCR vode in negativno kontrolo, v katero smo dodali vse reagente, ki se uporabljajo skozi postopek izolacije. Nato smo vzorce skupaj s kontrolami inkubirali 30 min na  $56 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  v stresalni vodni kopeli.
- Ponovno smo na kratko centrifugirali pri 10.000 rpm. Raztopini smo dodali 200  $\mu\text{l}$  pufra AL in mešanico vorteksirali 15 s. Inkubacija za 10 min na  $70 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Po kratkem centrifugiranju pri 10.000 rpm, smo dodali 200  $\mu\text{l}$  etanola (96 – 100 %) in vorteksirali 15 s ter centrifugirali na kratko.
- Mešanico smo odpipetirali na QIAamp kolono in centrifugirali 1 min pri 8.000 rpm. Filtrat smo skupaj z zbiralno epruvetko zavrgli.
- QIAamp kolono smo prenesli v 2 ml zbiralno epruvetko in na kolono odpipetirali 500  $\mu\text{l}$  pufra AW1 ter centrifugirali 1 min pri 8.000 rpm. Filtrat smo skupaj z zbiralno epruvetko zavrgli.
- QIAamp kolono smo ponovno vstavili v 2 ml zbiralno epruvetko. Na kolono smo odpipetirali 500  $\mu\text{l}$  pufra AW2 in centrifugirali 3 min pri 14.000 rpm. Filtrat smo skupaj z zbiralno epruvetko zavrgli.
- QIAamp kolono smo vstavili v novo 1,5 ml mikroepuvetko. Na membrano QIAamp kolone smo odpipetirali 200  $\mu\text{l}$  elucijskega pufra AE. Inkubirali 5 min na sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 min na 8000 rpm. Če smo opravili analizo še isti dan, smo shranili filtrat v hladilniku, če ne pa v zamrzovalniku na  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.3.2 Priprava mešanice za pomnoževanje

Vsi reagenti za pripravo mešanice so bili shranjeni v zamrzovalniku v sobi, ki je bila ločena od prostora, kjer smo izolirali DNA. Zelo je pomembno, da se izognemo morebitni kontaminaciji.

Reagente smo najprej odtalili, dobro premešali in centrifugirali, z izjemo sonde in reakcijske mešanice, ki sta zelo občutljiva in jih le na kratko centrifugiramo. Reagente smo dodali v 1,5 ml mikroepruvetko v predpisanih količinah, ki so navedene v preglednici 10.

Preglednica 10: Prikaz reagentov (in njihovih količin), ki so potrebni za analizo 1 vzorca z PCR v realnem času.

Reagenti	Koncentracija	Količina ( $\mu\text{l}$ / 1 vzorec)
Taqman reakcijska mešanica	5x	4
Začetni oligonukleotid OT-1559	400 nM	0,8
Začetni oligonukleotid 18-1	400 nM	0,8
Sonda 16S	300 nM	0,6
BSA pufer (pH 7,5)	10 mg/ml	0,3
Voda PCR		8,5
Skupaj		20 $\mu\text{l}$
DNA		5 $\mu\text{l}$

V prostoru, kjer smo izvajali izolacijo, smo pripravili steklene kapilare, prirejene za napravo Light Cycler, s katero smo izvajali PCR v realnem času. Reakcijska mešanica je zelo občutljiva, zato postavimo kapilare in mešanico v hladilno posodico, ki preprečuje, da bi prišlo do napačnega delovanja. V vsako kapilarno odpipetiramo 15  $\mu\text{l}$  reakcijske mešanice in 5  $\mu\text{l}$  izolirane DNA. Ob tem ne smemo pozabiti na pripravo pozitivne in negativne kontrole. Pri pozitivni kontroli dodamo k reakcijski mešanici sev *C. jejuni* ATCC 33291, pri negativni kontroli pa le vodo PCR.

Zaradi pipetiranja majhnih količin lahko pride zelo hitro do odstopanj v rezultatih. Za izognitev tem odstopanjem in za pridobitev čim bolj natančnih rezultatov smo vse vzorce obdelali v paralelnih ponovitvah.



Slika 8: Steklene kapilare za PCR v realnem času v aparatu.



Slika 10: Rotor z vstavljenimi kampilarami (od zgoraj).

Slika 9: Rotor z vstavljenimi kampilarami (od spodaj).

Rotor vstavimo v napravo LightCycler ter na računalniku nastavimo program, ki je predpisan za analizo bakterij rodu *Campylobacter*.

Preglednica 11: Prikaz pogojev reakcije za izvedbo PCR v realnem času za določanje termotolerantnih bakterij *Campylobacter*.

Stopnja v reakciji PCR v realnem času	Čas (s)	Temperatura (°C)	Število ciklov
Predinkubacija (aktivacija DNA polimeraze in denaturacija vzorčne DNA)	600	95	1
Denaturacija	10	95	45
Prileganje primerjev	20	58	
Podaljševanje	1	72	
Ohlajanje	30	40	1



Slika 11: Izvajanje PCR v realnem času s sočasnim prikazom rezultatov na računalniku.

Na koncu reakcije moramo analizirati rezultate. Za ovrednotenje rezultatov moramo poznati proces delovanja detekcije s PCR v realnem času. Produkta detektiramo z uporabo sonde, katera hibridizira s homolognim zaporedjem. Sonda se s Taq polimerazo razgradi, zaradi česar se sprostita barvili iz sonde, nakar aparat zazna sevanje. Po določenem številu ciklov pomnoževanja izmerjeni signal preseže vrednost praga, kar imenujemo prazni cikel (Ct). Na ZZV Maribor so optimizirali metodo za napravo Light Cycler in ovrednotimo rezultat kot pozitiven, kadar je signal presežen pred 35-im ciklom, vse vrednosti nad tem ciklom pa ovrednotimo kot negativen rezultat.

### **3.3.4 Ugotavljanje meje občutljivosti klasične in molekularne metode**

Pripravili smo suspenzije celic referenčnega seva *C. jejuni* ATCC 33291 z optično gostoto 0,5 enote po McFarlandu, ki ustreza koncentraciji  $10^8$  CFU/ml. Nato smo suspenzijo redčili tako, da smo v 9 ml fiziološke raztopine dodali 1 ml suspenzije celic. Ta korak smo ponavljali tako dolgo, da smo dobili željene koncentracije  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  in  $10^0$  CFU/ml. Ko so bile pripravljene bakterijske suspenzije, smo načrtno kontaminirali mesne pripravke, piščančje meso in pitno vodo. Morali smo zagotoviti, da so bili ti vzorci negativni na kampilobakte, zato smo poiskali že pregledane mesne pripravke in piščančje meso, katerih PCR rezultat je bil negativen. Nadaljnji postopek za odkrivanje kampilobaktrov s pomočjo klasične metode je potekal po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.1 in 3.2.2. Hkrati pa smo odkrivali kampilobakte tudi z molekularno metodo, katere postopek je opisan pod točko 3.2.3. Poizkus smo opravili v treh ponovitvah za pitno vodo in piščančje meso ter v eni ponovitvi za mesne pripravke.

## 4 REZULTATI

V skladu s cilji naloge smo hoteli ugotoviti čim bolj učinkovito obogatitev za odkrivanje kampilobaktrov, zato smo izmed štirih obogatitev poiskali tisto, ki je bila najbolj selektivna in občutljiva. Za pridobitev teh rezultatov smo uporabili 31 vzorcev površinskih vod, 10 vzorcev mesnih pripravkov in 10 vzorcev svežega piščančjega mesa. Vsak vzorec je bil obogaten v štirih različnih obogatitvah in analiziran s klasično gojitveno metodo po ISO standardu 17995 in 10272-1 ter s PCR v realnem času. V eksperimentalnem delu te diplome smo določili tudi mejo občutljivosti uporabljenih metod za odkrivanje kampilobaktrov v načrtno kontaminiranih vzorcih. Delo je potekalo od septembra 2009 do januarja 2010 v referenčnem laboratoriju za ugotavljanje prisotnosti bakterij *Campylobacter* v vzorcih živil ZZV Maribor.

### 4.1 UČINKOVITOST OBOGATITVE GLEDE NA TIP VZORCEV IN METODO ODKRIVANJA TERMOTOLERANTIH KAMPILOBAKTROV V NARAVNO KONTAMINIRANIH VZORCIH

Selektivnost obogatitve je ključni korak za odkrivanje oziroma izolacijo kampilobaktrov. Iskanje čim bolj učinkovite oziroma selektivne obogatitve traja še danes. Zato smo se lotili raziskave, v katero smo vključili štiri različne obogatitve. Mednarodni ISO standard določa obogatitev v gojišču Preston ali Bolton, zato smo ti obogatitvi primerjali z gojiščem Bolton brez krvi in gojiščem Bolton s spremenjenimi antibiotiki. Predhodne raziskave so pokazale, da kri lahko inhibira PCR reakcijo, zato nas je zanimal učinek krvi v obogatitvenem gojišču. Pri klasičnih gojitvenih metodah pa velikokrat poročajo o preraščanju kompetitivne mikrobiote na ploščah in smo zato hoteli preveriti učinkovitost dodatka drugih antibiotikov h gojišču Bolton. Predvidevali smo, da je učinkovitost določene obogatitve odvisna od tega, kateri vzorec preučujemo in s kakšno metodo.

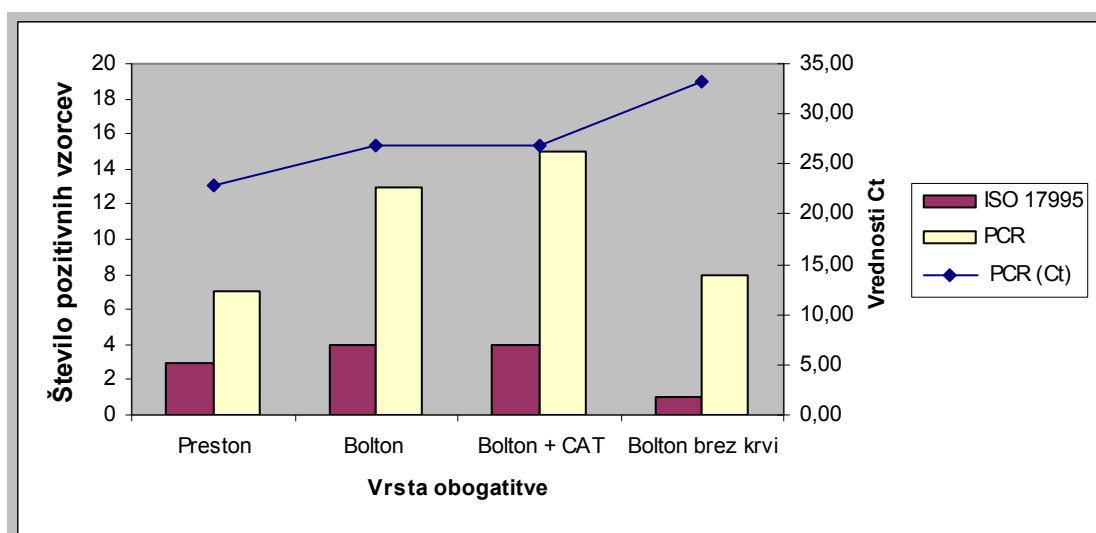
#### 4.1.1 Vzorci naravno kontaminiranih površinskih vod

Vključili smo 31 vzorcev površinske vode, med katere spada voda iz potokov, ribnikov, rek in jezer. Vsak vzorec je bil obogaten v štirih različnih obogatitvah in bil analiziran s klasično gojitveno metodo ter s PCR v realnem času. Preglednica 12 prikazuje skupno število zaznanih pozitivnih in negativnih vzorcev z obema metodama. Podrobnejši rezultati vseh opravljenih preiskav pa so zbrani v prilogi A.

Preglednica 12: Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v naravno kontaminiranih vzorcih površinskih vod glede na uporabljeno metodo.

Vzorec	ISO 17995 / PCR				
	Obogatitev	+ / +	- / +	+ / -	- / -
Površinska voda	Preston	3	4	0	24
	Bolton	4	9	0	18
	Bolton + CAT	4	11	0	16
	Bolton brez krvi	1	7	0	23
Skupaj		12	31	0	79

Iz rezultatov, zbranih v preglednici 12 težko povzamemo, katera obogatitev je bila optimalna, zato smo za boljšo predstavitev prikazali rezultate na sliki 12. Iz pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da sta se pri klasični metodi kot najboljša izkazala gojišči Bolton in Bolton s spremenjenimi antibiotiki. Z uporabo teh dveh gojišč smo uspeli izolirati kampilobakte iz štirih vzorcev vod, vendar le iz enega vzorca z obema gojiščema hkrati (Podrobni rezultati vseh opravljenih analiz so zbrani v prilogi A). Pri molekularni metodi pa se je najbolje izkazalo gojišče Bolton + CAT, saj smo odkrili kampilobakte celo v petnajstih vzorcih. Na podlagi teh podatkov lahko sklepamo, da je gojišče Bolton + CAT v primeru površinskih vod bolj primeren za uporabo od gojišč Preston in Bolton, ki ju priporoča mednarodni ISO standard. Iz pridobljenih rezultatov lahko sklepamo tudi na to, da kri v obogatitvenem gojišču pozitivno vpliva na rast kampilobaktrov v vzorcih, saj je bilo število odkritih pozitivnih vzorcev precej večje v gojiščih s krvjo kot pa brez nje.



Slika 12: Število odkritih pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranih površinskih vod.



Iz slike 12 lahko razberemo povprečne vrednosti Ct, ki so precej velike, predvsem za gojišče Bolton brez krvi. Te vrednosti povedo, da so bili po obogatitvi kampilobktri prisotni v zelo majhni koncentraciji, saj je bilo potrebno veliko ciklov, da jih je naprava zaznala. Iz tega lahko sklepamo, da kri nima vpliva na detekcijo kampilobaktrov s PCR, vendar pa ima pozitivni vpliv na regeneracijo in rast bakterij, saj so si le te v gojišču Bolton s krvjo veliko bolj in prej opomogle kot v gojišču Boltonu brez krvi. Temu ustreza tudi bistveno večje število odkritih pozitivnih vzorcev s klasično, predvsem pa molekularno metodo odkrivanja.

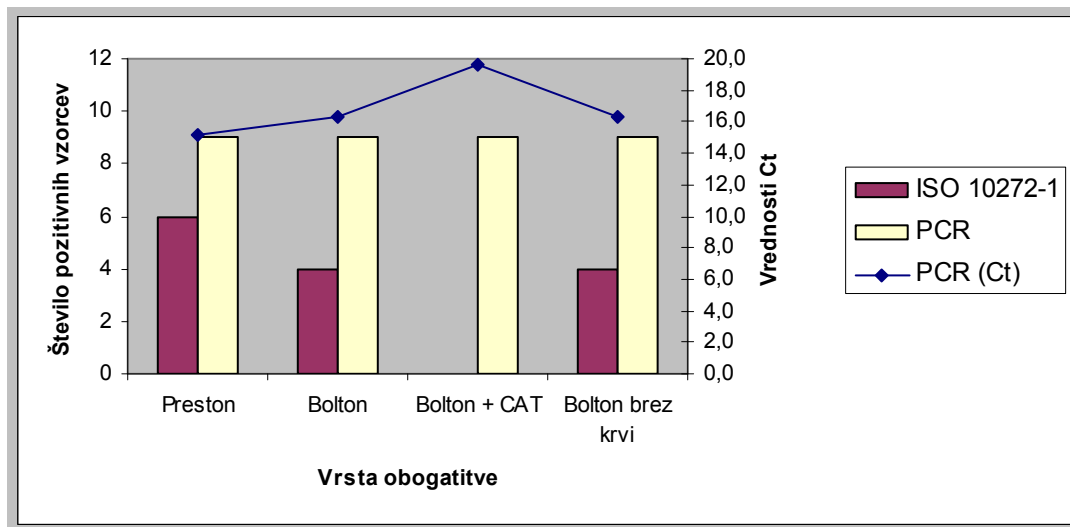
Potrebno je tudi upoštevati, da pri klasični metodi analiziramo posamezne kolonije, kar pomeni, da izberemo kolonijo za nadaljnjo identifikacijo po lastni presoji. Obstaja možnost, da smo kolonije kampilobaktrov pridobili na ploščah, vendar jih nismo identificirali, zaradi izbire napačnih kolonij za nadaljnjo analizo.

#### 4.1.2 Vzorci naravno kontaminiranega piščančjega mesa

Analizirali smo 10 vzorcev piščančjega mesa. Piščanci so bili celi ali pa le njihovi kosi. Piščančje meso smo prenesli v sterilno vrečko in prilili 180 ml fiziološke raztopine. Nato smo homogenizirali ter 25 ml uporabili za nadaljnjo analizo. Vsak vzorec (25 ml izpirka) je bil obogaten v štirih različnih obogatitvah in bil analiziran s klasično gojitveno metodo ter s PCR v realnem času. Preglednica 13 prikazuje skupno število zaznanih pozitivnih in negativnih vzorcev z obema metodama. Podrobnejši rezultati vseh opravljenih preiskav pa so zbrani v prilogi B.

Preglednica 13: Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranega piščančjega mesa glede na uporabljeno metodo.

Vzorec	ISO 10272-1 / PCR				
	Obogatitev	+ / +	- / +	+ / -	- / -
Sveže piščančje meso	Preston	6	3	0	1
	Bolton	4	5	0	1
	Bolton + CAT	0	9	0	1
	Bolton brez krvi	4	5	0	1
Skupaj		14	22	0	4



Slika 13: Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10271-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranega piščančjega mesa.

Ob upoštevanju detekcije s klasično metodo in vrednosti Ct se je za najboljšega izkazalo gojišče Preston, ki mu tesno sledita gojišči Bolton in Bolton brez krvi. Gojišče Bolton + CAT je bil pri detekciji s klasično metodo najmanj selektiven, saj so bile plošče mCCDA preraščene s kompetitivno mikrobioto, zaradi česar nismo uspeli izolirati kampilobaktrov. Ti rezultati kažejo, da uporaba gojišča Bolton + CAT za detekcijo kampilobaktrov s klasično metodo ni smotrna.

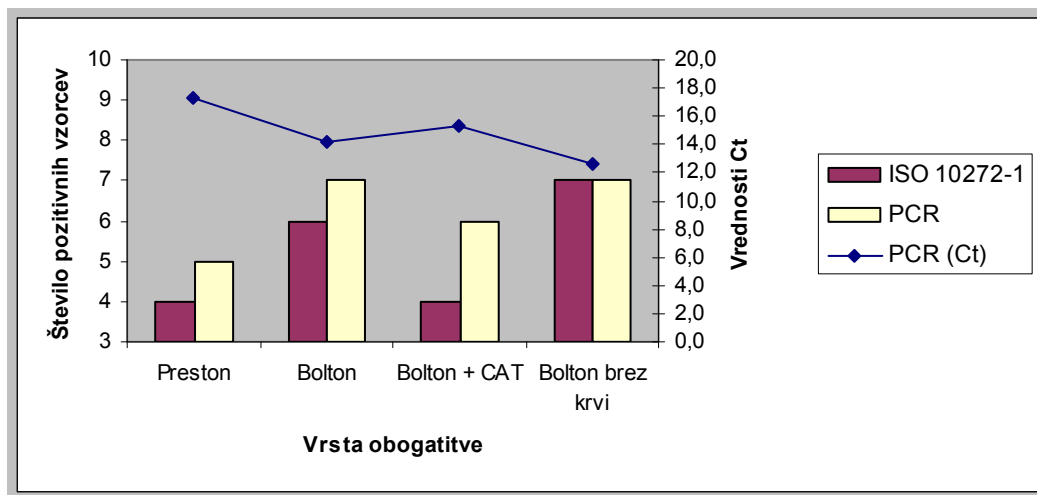
V gojišču Bolton brez krvi smo zaznali enako število kampilobaktrov kot v gojiščih s krvjo (gojišče Preston, Bolton, Bolton + CAT). Prav tako nismo zaznali vpliv krvi na inhibicijo PCR reakcije, saj vrednosti Ct pri gojiščih s krvjo ne odstopajo od vrednosti pri gojiščih brez krvi.

### 4.1.3 Vzorci naravno kontaminiranih mesnih pripravkov

Analizirali smo 10 vzorcev mesnih pripravkov. Med mesne pripravke sodi meso, ki ima dodana druga živila, začimbe ali dodatke oz. meso, ki je bilo obdelano s postopkom, ki ne spreminja notranje celične zgradbe mesa, zaradi česar bi značilnosti svežega mesa izginile. S sterilnim skalpelom in pinceto smo si pomagali, da smo pridobili 25 g vsakega vzorca, ki smo ga nato obogatili v štirih različnih obogatitvah in ga analizirali s klasično gojitveno metodo ter s PCR v realnem času. Preglednica 14 prikazuje skupno število detektiranih pozitivnih in negativnih vzorcev z obema metodama. Podrobnejši rezultati vseh opravljenih preiskav pa so zbrani v prilogi 3.

Preglednica 14: Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranih mesnih pripravkov glede na uporabljeno metodo.

Vzorec	ISO 10272-1 / PCR				
	Obogatitev	+ / +	- / +	+ / -	- / -
Mesni pripravki	Preston	4	1	0	5
	Bolton	6	1	0	3
	Bolton + CAT	4	2	0	4
	Bolton brez krvi	7	0	0	3
Skupaj		21	4	0	15



Slika 14: Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranih mesnih pripravkov.

Pri mesnih pripravkih se je kot najboljša obogatitev izkazalo gojišče Bolton brez krvi, saj je tako pri klasični kot pri molekularni metodi omogočil detekcijo enakega števila pozitivnih vzorcev. Sledilo je gojišče Bolton, kjer smo s klasično metodo zaznali le en pozitiven vzorec manj. Dokaj slabo ocenjeni pa sta bili gojišči Bolton + CAT in Preston, saj smo pri obeh zaznali manjše število pozitivnih vzorcev.

Tako kot pri piščančjem mesu tudi pri mesnih pripravkih ne opazimo, da bi kri pripomogla k boljši regeneraciji kampilobaktrov. V tem primeru je kri kvečjemu slabo vplivala na kampilobakte, saj smo v gojišču Bolton brez krvi zaznali največ kampilobaktrov. Vendar pa je to odstopanje zanemarljivo. Tudi tukaj lahko potrdimo, da kri ne inhibira PCR reakcije, ker so povprečne vrednosti Ct (npr. v gojišču Boltonu je povprečna vrednost 14) le malenkost višje od vrednosti Ct v gojišču Bolton brez krvi (v gojišču Boltonu brez krvi je povprečna vrednost 12).

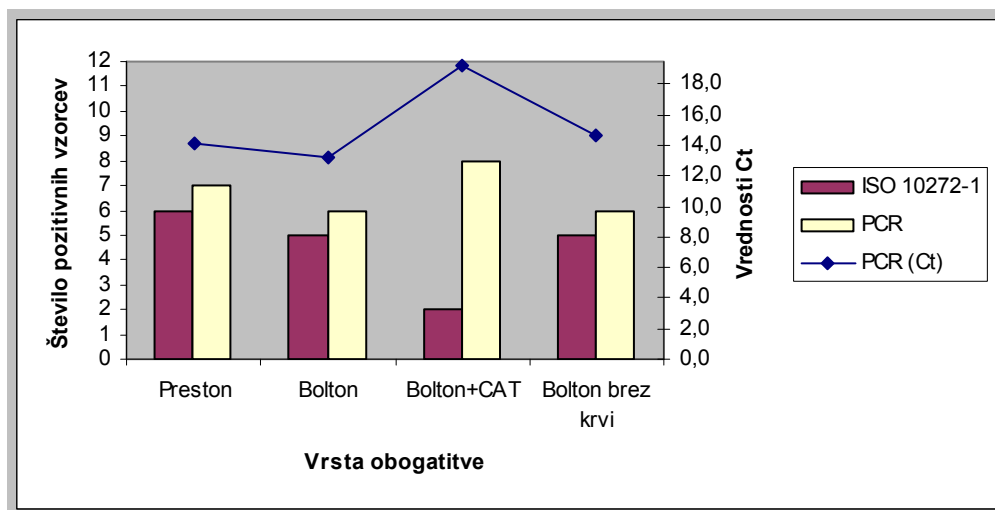
#### 4.1.4 Vzorci naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa

Vzorci zamrznjenega piščančjega mesa so bili predhodno analizirani s klasično metodo in ovrednoteni kot pozitivni na kampilobakte. Po tej analizi so bili daljše obdobje (3 do 6 mesecev) zamrznjeni pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorce smo prestavili iz zamrzovalnika v hladilnik, da se je meso počasi odtajalo. Šele naslednji dan smo analizirali 10 vzorcev piščančjega mesa.

Preglednica 15 prikazuje skupno število detektiranih pozitivnih in negativnih vzorcev s klasično in molekularno metodo. Podrobnejši rezultati vseh opravljenih preiskav pa so zbrani v prilogi D.

Preglednica 15: Število pozitivnih in negativnih rezultatov detekcije kampilobaktrov v vzorcih naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa glede na uporabljeno metodo.

Vzorec	ISO 10272-1 / PCR				
	Obogatitev	+ / +	- / +	+ / -	- / -
<b>Zamrznjeno piščančje meso</b>	Preston	6	1	0	3
	Bolton	5	1	0	4
	Bolton + CAT	2	6	0	2
	Bolton brez krvi	5	1	0	4
Skupaj		18	9	0	13



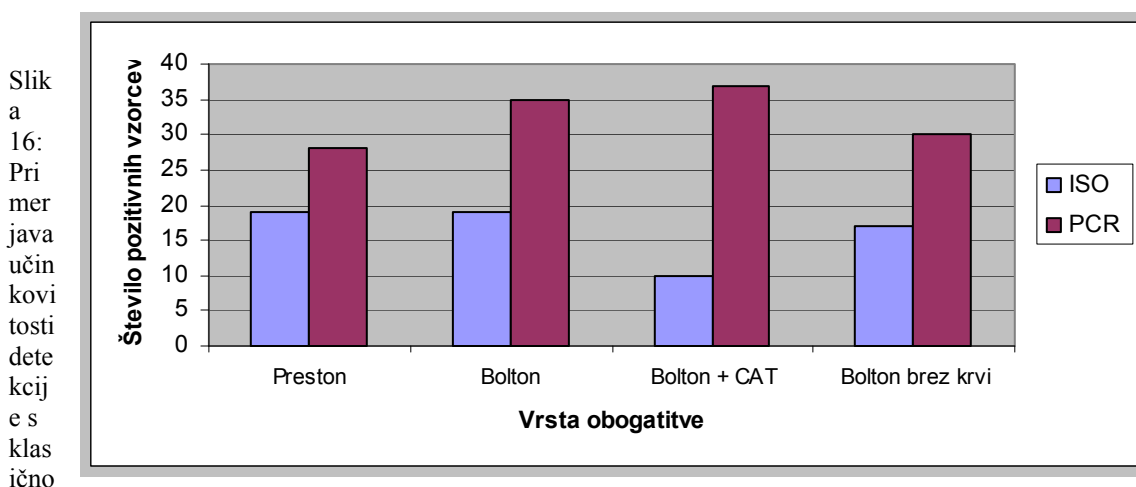
Slika 15: Število pozitivnih vzorcev s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) ter pripadajoče povprečne vrednosti Ct slednje metode za vzorce naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa.

Gojišče Bolton + CAT se je izkazalo najboljše v detekciji z molekularnimi metodami, vendar najslabše v kombinaciji s klasično detekcijsko metodo, saj so bile plošče ponovno preraščene s kompetitivno mikrobioto in nismo uspeli izolirati kampilobaktrov v več kot dveh vzorcih. Gojišče Preston je bilo najboljše, če primerjamo detekcijo pri obeh metodah, saj je bilo število pozitivno detektiranih vzorcev za obe metodi primerljivo (z molekularno metodo je bilo pozitivnih vzorcev 7, s klasično pa 6). Le temu sta sledili gojišči Bolton in Bolton brez krvi, ki sta podali enake rezultate. Detektiranih je bilo 6 pozitivnih vzorcev z molekularno metodo in 5 s klasično. Glede na dobljene rezultate bi morali določiti najboljšo obogatitev na podlagi vrste detekcije. Pri detekciji z molekularnimi metodami bi za najboljšo obogatitev izbrali gojišče Bolton + CAT, pri detekciji s klasičnimi metodami pa gojišče Preston.

Tudi v tem primeru nismo opazili, da bi kri pospeševala rast, saj sta se gojišči Bolton s krvjo in brez krvi izkazali enako dobro. Tudi vrednosti Ct v gojiščih s krvjo niso odstopale od vrednosti Ct v gojiščih brez krvi, s čimer lahko ponovno potrdimo, da kri ne inhibira PCR reakcije.

#### 4.1.5 Občutljivost in selektivnost posamezne obogatitve

Pri rutinskih preiskavah ne bi bilo praktično uporabljati za vsak tip vzorca svojo obogatitev, zato smo preverili učinkovitost posamezne obogatitve ne glede na tip vzorca. Kot prikazuje slika 16, je bilo gojišče Bolton + CAT najboljše pri detekciji z molekularno metodo, vendar najslabše s klasično metodo, saj je bila problematična selektivnost gojišča in posledično preraščanje plošč s kompetitivno mikrobno združbo. Zato sta se pri klasični gojitveni metodi veliko bolje izkazali standardni gojišči Bolton in Preston (slika 16), katerima je z nekoliko nižjim številom odkritih pozitivnih vzorcev sledilo gojišče Bolton brez krvi.

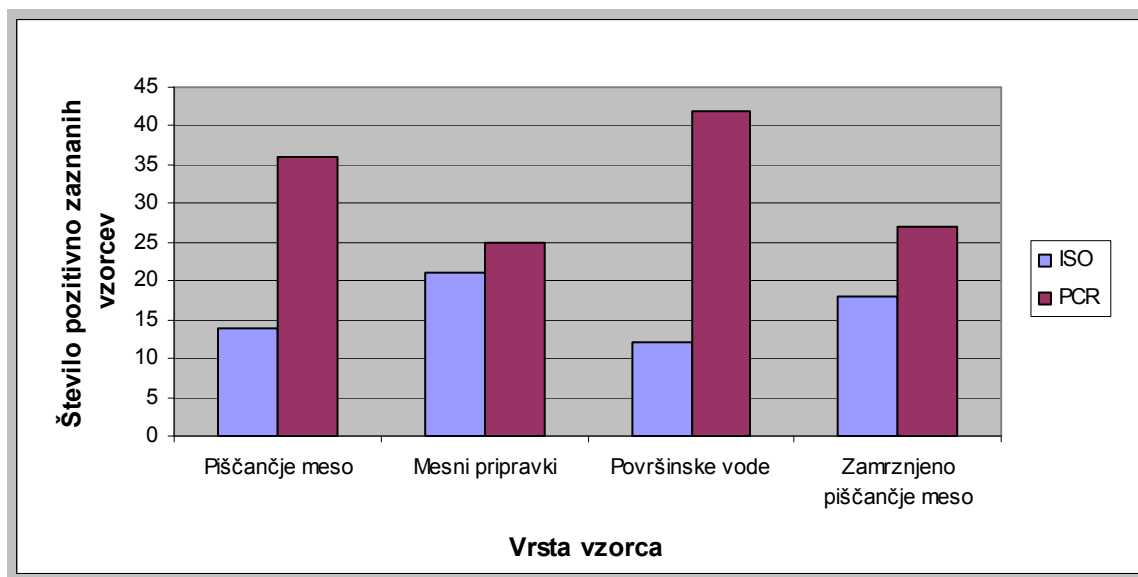


(ISO 10271-1 in 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) po obogatitvi, glede na uporabljeno obogatitveno gojišče, za vse vzorce vključene v raziskavo.

#### 4.1.6 Primerjava občutljivosti metod glede na tip vzorcev

Za posamezno vrsto živil smo sešteli pozitivne vzorce, v katerih smo zaznali kampilobakte s klasično in molekularno metodo. Iz Slike 17 je razvidno, da je bila molekularna metoda bolj občutljiva, saj je zaznala več pozitivnih vzorcev kot klasična metoda.

Še posebej je ta razlika očitna pri rezultatih analiz površinskih vod, pa tudi izpirkov piščančjega mesa. S tem smo potrdili predpostavko, da je molekularna metoda za dokazovanje kampilobaktrov bolj občutljiva kot klasična metoda.



Slika 17: Primerjava občutljivosti klasične (ISO 10272-1 in 17995) in molekularne metode (PCR v realnem času) glede na vrste vzorcev, ki so bili vključeni v raziskavo.

Razultati kažejo, da bi morali optimizirati gojišče Bolton + CAT, ki se je najbolje izkazalo v kombinaciji z molekularno detekcijsko metodo, a hkrati dalo slabe rezultate v kombinaciji s klasično metodo zaradi preslabe selektivnosti.

#### 4.2 UČINKOVITOST DETEKCIJE IN IZOLACIJE Z OBOGATITVIJO V RAZMERJU 1:4 V PRIMERJAVI Z OBOGATITVIJO V RAZMERJU 1:9

Standard ISO 10272-1 določa obogatitev 25 g vzorca v 225 ml gojišča Bolton. V našem raziskovalnem delu smo hoteli dokazati, da je obogatitev v 100 ml lahko enako ali celo bolj učinkovita od te, ki jo priporoča mednarodni standard.

Preglednica 16 prikazuje vzorce, kjer smo uspeli izolirati kampilobakte, in vrednosti Ct, pridobljene s PCR v realnem času. Nižja vrednost Ct pomeni, da so bili kampilobakti prisotni v večji koncentraciji, saj je bilo potrebno manj ciklov za zaznavo pomnoževanja DNA. Na podlagi spodnjega prikaza rezultatov lahko potrdimo hipotezo, da je obogatitev v razmerju 1:4 enako oziroma celo bolj učinkovita od obogatitve v razmerju 1:9, saj so bile vrednosti Ct v 8-ih vzorcih od 10-ih nižje od vrednosti Ct z obogatitvijo v 225 ml.

Pri detekciji s klasično metodo smo opazili odstopanje. Namreč, pri dveh vzorcih nismo zaznali kampilobaktrov pri obogatitvi v 100 ml gojišča Bolton, čeprav so pri obogatitvi v 225 ml bili zaznani. Prav tako je bil en vzorec pozitiven pri obogatitvi v 100 ml gojišča Bolton, vendar negativen pri obogatitvi v 225 ml. To bi lahko pripisali napačni presoji o izbiri kolonij

za precepitev in nadaljnjo identifikacijo. Vendar, da bi se prepričali o tem, da je po klasični metodi obogatitev v 100 ml gojišča Bolton enako oziroma bolj učinkovita kot v 225 ml gojišča Bolton, bi potrebovali večji nabor vzorcev.

Preglednica 16: Detekcija kampilobaktrov s klasično (ISO 10272) in molekularno metodo (PCR v realnem času) po obogatitvi v gojišču Bolton v razmerju 1:4 in razmerju 1:9 iz naravno kontaminiranih vzorcev piščančjega mesa in mesnih pripravkov.

Piščančje meso						
Številka vzorca	Obogatitev (100 ml)	ISO 10272-1	PCR (Ct)	Obogatitev (225 ml)	ISO 10272-1	PCR (Ct)
60056	Bolton	+	16,38	Bolton	+	16,34
60057	Bolton	+	14,05	Bolton	+	17,35
61034	Bolton	+	12,17	Bolton	+	12,58
61035	Bolton	+	14,62	Bolton	+	13,39
60981	Bolton	-	14,39	Bolton	+	14,77
60982	Bolton	-	15,73	Bolton	+	18,38
Mesni pripravki						
60074	Bolton	+	14,34	Bolton	+	16,52
60089	Bolton	+	12,88	Bolton	+	14,40
60094	Bolton	+	13,81	Bolton	+	15,85
60127	Bolton	+	15,63	Bolton	-	17,32

S klasično gojitveno metodo smo zaznali 9 pozitivnih vzorcev, ko smo uporabili obogatitvenem razmerju 1:9. Pri uporabi obogatitvenega razmerja 1:4 pa smo zaznali 8 pozitivnih vzorcev. Povprečna vrednost Ct (14,40) v razmerju 1:4 je nižja v primerjavi povprečne vrednosti Ct pri razmerju 1:9 (15,49). Na splošno je pri obeh metodah odstopanje minimalno, kar nam pove, da je obogatitveno razmerje 1:4 enako učinkovito kot razmerje 1:9.



#### 4.3 MEJA OBČUTLJIVOSTI KLASIČNE IN MOLEKULARNE DETEKCIJE KAMPILOBAKTROV V NAČRTNO KONTAMINIRANIH VZORCIH

Uporabili smo pitno vodo, mesne pripravke in zamrznjeno piščančje meso, ki smo jih načrtno kontaminirali s štirimi različnimi koncentracijami bakterijskih suspenzij ( $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  in  $10^0$  CFU/ml). Tako smo določili spodnjo mejo občutljivosti standardne in molekularne metode. Poizkus smo opravili v treh ponovitvah za pitno vodo in piščančje meso ter v eni ponovitvi za mesne pripravke.

V poizkusu določitve meje občutljivosti po načrtni kontaminaciji z referenčnim sevom *C. jejuni* ATCC 33291 smo tako s klasično kot tudi z molekularno metodo določili najnižjo mejo občutljivosti, ko smo načrtno kontaminirali pitno vodo. Pri pitni vodi smo zaznali spodnjo mejo občutljivosti pri  $10^0$  CFU/ml pri vseh obogatitvah, vendar v gojiščih Bolton, Bolton brez krvi in Bolton + CAT v dveh ponovitvah, v gojišču Preston pa le v eni. Primerjava rezultatov z rezultati, predstavljenimi na Sliki 12, ne bi bila smiselna, saj moramo upoštevati, da ne gre za enak matriks, kajti v prvem primeru smo preučevali površinske vode, v primeru načrtno kontaminacije pa pitno vodo. Kljub temu se je v obeh primerih, tako za površinske kot za pitne vode, gojišče Preston izkazalo za najslabšo obogatitev.

Preglednica 17: Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v načrtno kontaminirani pitni vodi.

Pitna voda							
Koncentracija bakterij	Obogatitev	1. vzorec		2. vzorec		3. vzorec	
		ISO 17995	PCR (Ct)	ISO 17995	PCR (Ct)	ISO 17995	PCR (Ct)
$10^3$	Preston	+	16,24	+	16,24	+	25,07
	Bolton	+	13,62	+	14,10	+	14,78
	Bolton + CAT	+	13,90	+	13,64	+	15,87
	Bolton brez krvi	+	14,22	+	14,53	+	17,02
$10^2$	Preston	+	19,66	+	22,07	+	29,46
	Bolton	+	13,42	+	13,78	+	17,29
	Bolton + CAT	+	14,64	+	13,04	+	16,20
	Bolton brez krvi	+	16,31	+	15,07	+	17,81
$10^1$	Preston	+	26,24	+	26,73	-	-
	Bolton	+	14,19	+	14,30	-	-
	Bolton + CAT	+	13,82	+	14,25	-	-
	Bolton brez krvi	+	14,67	+	14,98	+	17,02
$10^0$	Preston	-	-	-	28,18	-	-
	Bolton	+	14,24	+	15,71	-	-
	Bolton + CAT	-	31,90	+	17,63	-	-
	Bolton brez krvi	+	15,71	+	17,04	-	-

Preglednica 18: Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v načrtno kontaminiranih mesnih pripravkih.

<b>Mesni pripravki</b>			
<b>Koncentracija bakterij</b>	<b>Obogatitev</b>	<b>ISO 10272-1</b>	<b>PCR (Ct)</b>
10 <sup>3</sup>	Preston	+	25,71
	Bolton	+	15,45
	Bolton + CAT	-	19,48
	Bolton brez krvi	+	15,62
10 <sup>2</sup>	Preston	-	-
	Bolton	+	20,34
	Bolton + CAT	-	19,92
	Bolton brez krvi	+	17,40
10 <sup>1</sup>	Preston	-	-
	Bolton	+	26,67
	Bolton + CAT	-	34,18
	Bolton brez krvi	+	22,93
10 <sup>0</sup>	Preston	-	-
	Bolton	+	22,57
	Bolton + CAT	-	34,31
	Bolton brez krvi	+	17,81

Spodnja meja občutljivosti z molekularno metodo je za vse obogatitve, z izjemo gojišča Preston, znašala 10<sup>0</sup> CFU/ml. Gojišče Preston se je v primeru načrtno kontaminacije mesnih pripravkov izkazal za neučinkovitega, saj ima spodnjo mejo občutljivosti zelo visoko, in sicer 10<sup>3</sup> CFU/ml. S klasično metodo smo spodnjo mejo občutljivosti pri 10<sup>0</sup> CFU/ml določili pri obogatitvi v gojišču Bolton in Bolton brez krvi, z molekularno metodo pa smo to mejo določili tudi v gojišču Bolton + CAT.

Preglednica 19: Rezultati detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v načrtno kontaminiranem zamrznjenem piščančjem mesu.

Zamrznjeno piščančje meso							
Koncentracija bakterij	Obogatitev	1. vzorec		2. vzorec		3. vzorec	
		ISO 10272-1	PCR (Ct)	ISO 10272-1	PCR (Ct)	ISO 10272-1	PCR (Ct)
10 <sup>3</sup>	Preston	+	17,05	+	15,97	+	15,63
	Bolton	+	13,01	+	15,31	+	15,57
	Bolton + CAT	-	19,37	+	14,97	+	21,57
	Bolton brez krvi	+	13,94	+	16,65	+	15,91
10 <sup>2</sup>	Preston	+	21,36	+	16,19	+	16,80
	Bolton	+	15,91	+	16,29	+	26,64
	Bolton + CAT	-	34,91	+	17,19	-	20,45
	Bolton brez krvi	+	15,24	+	18,07	+	14,65
10 <sup>1</sup>	Preston	+	22,46	+	17,73	+	17,74
	Bolton	-	14,83	+	14,25	+	13,45
	Bolton + CAT	-	-	+	31,51	+	31,26
	Bolton brez krvi	+	15,39	+	16,47	+	16,70
10 <sup>0</sup>	Preston	+	27,11	+	21,20	-	-
	Bolton	+	16,36	-	-	-	-
	Bolton + CAT	-	32,18	-	-	+	15,87
	Bolton brez krvi	+	23,68	+	15,47	+	17,84

Pri piščančjem mesu je samo gojišče Bolton brez krvi, tako z molekularno kot s klasično metodo, v vseh treh ponovitvah doseglo spodnjo mejo občutljivosti pri 10<sup>0</sup> CFU/ml. Gojišče Preston je doseglo v dveh, gojišči Bolton in Bolton + CAT pa le v eni. Vzorci piščančjega mesa, ki smo jih načrtno kontaminirali, so že bili v laboratoriju Oddelka za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor predhodno analizirani in identificirani kot negativni. Vzorci so bili shranjeni v zamrzovalniku pri -25 °C, zato je rezultate potrebno primerjati z zamrznjenim piščančjim mesom.

Za določitev optimalne obogatitve za zamrznjeno piščančje meso bi morali dodatno proučiti večje število vzorcev, da bi dobili bolj natančne rezultate.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V našem eksperimentalnem delu smo se osredotočili na pomen obogatitve pri detekciji termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*. Prav tako smo hoteli preučiti vpliv različnih obogatitev glede na vrsto vzorcev in nenazadnje tudi vpliv samih metod, s katerimi odkrivamo te bakterije v vzorcih hrane in vode.

### 5.1 RAZPRAVA

V Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor uporabljajo obogatitve in metode, ki so predpisane po standardu ISO. Zavedamo se, da s temi predpisi ne moremo pridobiti optimalnih rezultatov. Naš glavni cilj je bil optimizacija detekcije termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*, zato smo se lotili raziskave, v kateri smo hoteli dokazati, da je očitna razlika v številu pozitivnih vzorcev, če upoštevamo vpliv tipa vzorcev, obogatitve in metode odkrivanja.

#### 5.1.1 Učinkovitost obogatitve glede na tip vzorcev in metodo odkrivanja

##### 5.1.1.1 Vzorci naravno kontaminiranih površinskih vod

Gojišče Bolton + CAT se je izkazalo za najbolj učinkovitega pri detekciji kampilobaktrov v površinskih vodah. Pri vodah je pogost problem, da enterokoki prerastejo kampilobakte, zaradi česar lahko sklepamo, da vsebovani antibiotik teikoplanin, ki inhibira rast enterokokov, v kombinaciji z drugimi antibiotiki, ki sestavljajo to obogatitev, zelo dobro zavirajo rast enterokokov in drugih bakterij. Pomembna ugotovitev, ki smo jo pridobili s to raziskavo, je ta, da se gojišče Preston ni izkazalo kot primeren izbor za obogatitev (slika 12 preglednica 12, priloga A). Njegovo delovanje na ta tip vzorca ima verjetno preveč selektiven učinek in posledično zavira in deluje na rast samih kampilobaktrov. Ti rezultati so pomembni, saj standard ISO priporoča to obogatitev za detekcijo kampilobaktrov v vodah. To pomeni, da se to gojišče uporablja v rutinskih laboratorijih. Prav tako se uporablja pri epidemioloških študijah, zaradi česar je verjetno podcenjeno število kampilobaktrov v površinskih vodah.

Jasson in sod. (2009) so dokazali, da je potreben daljši čas za detekcijo kampilobaktrov, obogatenih v gojišču Preston v primerjavi z gojiščem Bolton. To dodatno dokazuje, da določene sestavine v gojišču Preston delujejo zaviralno na rast kampilobaktrov. Te navedbe se se ujemajo z rezultati naše raziskave.

Vse izolate, ki smo jih pridobili s klasično metodo, smo zamrznili s pomočjo seta Microbank pri temperaturi na  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To nam je zelo pomagalo pri kasnejšem reševanju problema, ki je nastal pri spornem rezultatu za površinske vode. Namreč, s klasično metodo smo zaznali pozitiven vzorec, z molekularno metodo pa je bil isti vzorec ovredoten za negativnega. Zaradi

tega neskladja smo odmrznili shranjen izolat in ga ponovno zaznali z molekularno metodo. Rezultat, ki smo ga dobili po ponovni obdelavi, je bil pozitiven, s čimer smo potrdili, da je prišlo do napake v pripravi vzorcev za detekcijo s PCR v realnem času. Sklepamo, da je do tega neskladja prišlo zaradi nenatančnega pipetiranja po centrifugiranju oziroma da smo usedlino, v kateri so bile prisotne celice, odpipetirali.

Yang in sod. (2003) so ravno tako poročali o enem vzorcu, ki je bil negativen z molekularno metodo, vendar pozitiven s klasično metodo. Pri klasični metodi so uporabili obogatitev, PCR pa so izvedli direktno iz 1 ml vzorca. Njihova razlaga je bila, da je velikost vzorca uporabljene za klasično metodo veliko večja kot za PCR.

Problem pri detekciji kampilobaktrov z metodo PCR v naravno kontaminiranih vzorcih lahko predstavljajo tudi lažno pozitivni rezultati, zaradi prisotne proste DNA, mrtvih celic ali VBNC oblik (Wolffs in sod., 2005). Vendar v naši raziskavi lahko potrdimo, da je problem lažno negativnih vzorcev pri klasični metodi, saj smo z različnimi obogatitvami dobili različno število pozitivnih vzorcev (slika 13).

#### 5.1.1.2 Vzorci naravno kontaminiranega piščančjega mesa

Rezultati našega eksperimentalnega dela so nazorno pokazali, da ima vsak tip vzorca svojo optimalno obogatitev. Tako smo za piščančje meso ovrednotili gojišče Preston kot najbolj optimalno obogatitev (slika 13, preglednica 13, priloga B). S klasično metodo smo namreč dokazali, da je ta obogatitev najbolj selektivna, saj smo uspeli izolirati in potrditi kampilobakte v največjem številu. Detekcija z molekularno metodo je prav tako potrdila gojišče Preston za optimalno obogatitev. Čeprav smo v vseh obogatitvah z molekularno metodo zaznali enako število pozitivnih vzorcev, so bile najnižje povprečne vrednosti Ct po obogatitvi v gojišču Preston. Gojišči Bolton in Bolton brez krvi sta se izkazali za nekoliko slabšo obogatitev, vendar je bilo odstopanje minimalno. Za najslabšo obogatitev se je izkazalo gojišče Bolton + CAT, pri katerem nismo uspeli pridobiti nobenega izolata, prav tako pa so bile pridobljene povprečne vrednosti Ct, ki so neposredno odvisne od števila celic v gojišču po obogatitveni kultivaciji, najvišje.

Jasson in sod. (2009) so ugotovili, da je gojišče Preston bolj selektivno od gojišča Bolton, kadar so prisotne *E. coli*, ki izločajo beta laktamaze razširjenega spektra (ESBL). Kot vemo je pojavnost *E. coli* v surovem mesu zelo pogosta. Prav tako je na mesu zelo raznovrstna mikrobiota. S temi ugotovitvami lahko na splošno povzamemo, da je ob pričakovani raznovrstni mikrobioti smotrno uporabiti čim bolj selektivno obogatitev, za katero se je že večkrat izkazalo gojišče Preston.

### 5.1.1.3 Vzorci naravno kontaminiranih mesnih pripravkov

Za mesne pripravke se je najbolje izkazalo gojišče Bolton brez krvi, kateremu tesno sledi gojišče Bolton (slika 14, preglednica 14, priloga C). Pri obeh bogatitvah smo z molekularno metodo zaznali enako število vzorcev, le pri gojišču Bolton smo pridobili en izolat manj. Gojišči Preston in Bolton + CAT sta se v tem primeru izkazala za preveč selektivna, saj sta najverjetneje zavirala rast kampilobaktrov. To se najbolje kaže pri molekularnih metodah, kjer smo zaznali manjše število pozitivnih vzorcev, posledično pa smo pridobili tudi manj izolatov.

Yang in sod. (2003) so poročali, da niso opazili nobene razlike med mariniranimi in nemariniranimi izdelki. Enako lahko zaključimo iz rezultatov analiz vzorcev, vključenih v našo raziskavo. Prevalenca kampilobaktrov se ni razlikovala, iz česar bi lahko sklepali, da mariniranje ne uniči kampilobaktrov. Zanimivo je tudi to, da je bilo gojišče Bolton brez krvi najbolj učinkovito (slika 14, preglednica 14, priloga C). Tako lahko potrdimo zaključke Paulsena in sodelavcev, ki so trdili, da prisotnost krvi v gojiščih ni nujna, čeprav se izolacije razlikujejo glede na vrsto vzorca in metode, uporabljene za obogatitev. To ugotovitev je mogoče razložiti z dejstvom, da je v mariniranih izdelkih prisotnih veliko drugih sestavin (sol, začimbe, olje...), ki zmanjšujejo prisotnost kompetitivne mikrobiote.

### 5.1.1.4 Vzorci naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa

Glavni namen preučevanja zamrznjenih živil je zmožnost preživetja celic po zamrznitvi. Samo v dveh vzorcih od desetih kampilobaktrov nismo odkrili s klasično metodo. S pomočjo molekularne metode pa smo jih odkrili v vseh vzorcih (slika 15, preglednica 15, priloga D). To pomeni, da si kampilobaktri lahko opomorejo z obogatitvijo in se spremenijo iz negojljivih oblik v gojlive. Za zamrznjeno piščančje meso je v molekularnih metodah najboljše gojišče Bolton + CAT, s klasičnimi metodami pa gojišče Preston. V primeru obogatitve v gojišču Bolton + CAT nismo odkrili niti enega pozitivnega vzorca, kar je bila posledica dejstva, da je to gojišče najmanj selektivno in da druge kulture hitro prerastejo kampilobaktrami. Prav tako so Sandberg in sod. (2005) poročali, da zamrzovanje bistveno ne zmanjša število kampilobaktrov, saj so v 80 % vzorcev še vedno odkrili kampilobaktrami po 120 dnevih zamrzovanja. Zavedati se moramo, da zamrzovanje ni zadostno nadomestilo za varno ravnanje perutnine.

### 5.1.1.5 Selektivnost posamezne obogatitve

Gojišče Bolton + CAT se je izkazal za najboljšega pri detekciji z molekularno metodo, vendar najslabši s klasično metodo. Pri klasični gojitveni metodi se je veliko bolje izkazalo gojišče Bolton, kateremu tesno sledita gojišči Preston in Bolton brez krvi. Upoštevati moramo univerzalnost, ki nam pove, katera obogatitev je najboljša, če upoštevamo rezultate obeh metod. Na podlagi tega bi določili gojišče Bolton kot najbolj selektivno obogatitev.

Gojišče Bolton + CAT kaže potencial za učinkovito obogatitev, vendar bi bilo potrebno še raziskati najučinkovitejše razmerje antibiotikov, ki bi pripomoglo k višjemu odstotku izolacije na ploščah mCCDA.

#### 5.1.1.6 Primerjava občutljivosti metod glede na tip vzorcev

Iz slike 17 je razvidno, da je detekcija kampilobaktrov s PCR v realnem času bolj občutljiva, kar pomeni, da smo s to metodo zaznali več pozitivnih vzorcev. Največje odstopanje smo odkrili pri vzorcih površinskih vod, kjer smo z molekularno metodo zaznali 42 pozitivnih vzorcev, s klasično metodo pa le 12. Pri vzorcih piščančjega mesa je bila razlika v številu pozitivnih vzorcev nekoliko manjša, vendar še vedno velika, saj smo z molekularno metodo zaznali 36 pozitivnih vzorcev, s klasično pa le 14. Pri vzorcih zamrznjenega piščančjega mesa smo zaznali 27 pozitivnih vzorcev z molekularno metodo in 18 pozitivnih vzorcev s klasično metodo. Najmanj razlik v rezultatih smo dobili pri mesnih pripravkih, kjer je bilo odstopanje le 16 %, in sicer je bilo z molekularno metodo detektiranih 25 pozitivnih vzorcev, s klasično pa 21. Yang in sod. (2003) so izvedli študijo, kjer so uporabili PCR v realnem času za kvantitativno ugotavljanje *C. jejuni* v perutnini, mleku in okoljskih voda ter te rezultate primerjali s klasično metodo. Prišli so do enakega zaključka, da je razmerje pozitivnih rezultatov višje pri PCR kot pri klasični metodi. Razlog za takšno razliko so pripisali neogljivim oblikam, ki jih s klasično metodo ne moremo zaznati. Vendar naša raziskava kaže, da ni vzrok samo v tem, saj smo pri uporabi določenih obogatitev lahko izolirali kampilobakte. Torej je vzrok za manjšo občutljivost klasične metode tudi izbor obogatitve. Kljub prednostim molekularne metode v hitrosti in občutljivosti je metoda draga, delovno zelo intenzivna in ne zagotavlja pridobitve izolata za nadaljnjo identifikacijo, zaradi česar ima detekcija s klasično gojitveno metodo neprecenljivo vlogo, kljub temu da je pokazala nižjo občutljivost in daljši čas za pridobitev rezultatov.

#### 5.1.2 Učinkovitost izolacije z obogatitvijo v razmerju 1:4 v primerjavi z obogatitvijo v razmerju 1:9

Obogatitev v gojišču Bolton v razmerju 1:4 (25g vzorca v 100 ml gojišča) se je izkazala za enako učinkovito kot obogatitev v razmerju 1:9 (25g vzorca v 225 ml gojišča). Študija, ki so jo izvedli Oyarzbal in sod. (2007) z metodo določanja najbolj verjetnega števila bakterij pa nakazuje celo na boljše učinkovitost razmerja 1:4 za detekcijo z gojenjem bakterij. Da bi lahko potrdili njihove rezultate, smo po obogatitvi v obeh razmerjih preizkušali učinkovitost standardne metode ISO in PCR v realnem času. Potrdili smo naša predvidevanja, da je bolje uporabiti manjši volumen obogatitve oziroma manjše razmerje, saj imamo več možnosti, da zajamemo večjo količino celic, ko prenašamo vzorec na plošče ali v mikrocentrifugirke. Tako z ekonomskega kot s praktičnega vidika bi bilo v nadaljnje pri rutinskih preiskavah smotno uporabljati 1:4 razmerje.

### 5.1.3 Meja občutljivosti klasične in molekularne detekcije kampilobaktrov v načrtno kontaminiranih vzorcih

Pri umetni kontaminaciji pitne vode smo v gojiščih Bolton, Bolton brez krvi in Bolton + CAT določili spodnjo mejo občutljivosti pri  $10^0$  CFU/ml v dveh ponovitvah, v gojišču Preston pa le v eni. Prav tako so vrednosti Ct za gojišče Preston nekoliko višje od ostalih obogatitev, zato bi lahko zaključili le, katera obogatitev je bila najmanj uspešna. Čeprav se je gojišče Preston izkazalo za najslabšega, ta rezultat ne moremo primerjati z rezultati na sliki 12, saj so to podatki za naravno kontaminirane vzorce površinskih in ne pitnih vod.

Po umetni kontaminaciji mesnih pripravkov z referenčnim sevom *C. jejuni* ATCC 33291 smo dokaj hitro ugotovili in potrdili že navedena dejstva, da sta obogatitvi v gojiščih Preston in Bolton + CAT najmanj primerni za izbiro. V gojišču Bolton + CAT po klasični metodi nismo zaznali kampilobaktrov niti pri umetni kontaminaciji z  $10^3$  CFU/ml *C. jejuni*. Z molekularno metodo pa smo zaznali kampilobaktrre tudi pri umetni kontaminaciji z  $10^0$  CFU/ml *C. jejuni*, kar potrjuje naša predvidevanja, da je gojišče Bolton + CAT premalo selektivno, saj se kompetitivna mikrobiota močno razraste, zaradi česar ne moremo pridobiti izolata. Veliko nasprotje tej obogatitvi je gojišče Preston, ki je preveč selektivno, saj smo kampilobaktrre zaznali tako s klasično kot z molekularno metodo le pri umetni kontaminaciji z  $10^3$  CFU/ml *C. jejuni*. Glede na najnižje vrednosti Ct bi lahko zaključili, da je gojišče Bolton brez krvi najbolj primerna obogatitev za detekcijo kampilobaktrov v mesnih pripravkih.

Pri umetni kontaminaciji zamrznjenega piščančjega mesa se je najbolje izkazalo gojišče Bolton brez krvi, saj je v vseh treh ponovitvah omogočilo detekcijo kampilobaktrov pri  $10^0$  CFU/ml. Po učinkovitosti sta mu sledili gojišči Preston in Bolton + CAT. Po naših ugotovitvah lahko trdimo, da je Preston boljši pri detekciji s klasičnimi metodami, saj se v tem primeru izkaže njegova najboljša selektivnost. Gojišče Bolton + CAT je bilo najučinkovitejše pri detekciji z molekularnimi metodami. Presentljivo pa se je gojišče Bolton izkazalo za najmanj učinkovitega, saj smo zaznali kampilobaktrre pri koncentraciji  $10^0$  CFU/ml le v enem vzorcu.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih pridobili Yang in sod. (2003), saj je bila tudi pri nas spodnja meja zaznavnosti 1 CFU/ml, tako za klasično metodo kot za PCR v realnem času. Seveda teče iskanje in razvoj novih metod tudi v smeri direktne detekcije iz živila, torej brez obogatitve. Kot poročajo v najnovejši objavi je meja občutljivosti direktne detekcije višja, in sicer 10 CFU/ml za metodo PCR. Z molekularno metodo so dobili visok odstotek pozitivnih vzorcev (87 %), medtem ko s klasično metodo niso uspeli izolirati kampilobaktrov v nobenem vzorcu (Rantsiou in sod., 2010).



### 5.1.3.1 Občutljivost detekcije v naravno in načrtno kontaminiranih vzorcih

Če ne upoštevamo tipa vzorcev, se je v načrtno kontaminiranih vzorcih najbolje izkazalo gojišče Bolton brez krvi, kateremu je sledilo gojišče Bolton. Gojišči Preston in Bolton + CAT se nista izkazala kot dober izbor za obogatitev. Gojišče Preston je bilo boljše pri detekciji s klasično metodo, medtem ko je bilo gojišče Bolton + CAT boljše pri detekciji z molekularno metodo. Pri naravno kontaminiranih vzorcih pa se je izkazalo gojišče Bolton, kateremu je tesno sledilo gojišče Bolton brez krvi. Torej sta ti dve obogatitvi izkazali največjo selektivnost od vseh preučevanih obogatitev. Gojišče Bolton + CAT se je sicer izkazalo v detekciji z molekularnimi metodami, vendar nam je dalo veliko premalo izolatov po klasični metodi, da bi ga lahko uporabljali v rutinskih preiskavah. Gojišče Preston pa priporočajo za uporabo, zato bi na podlagi naših rezultatov bilo potrebno še raziskati njegovo selektivnost in tako preveriti, če je le-ta resnično primeren za rutinske preiskave.

Na podlagi preučevanih vzorcev smo povzeli, da kri ne vpliva na boljšo regeneracijo kampilobaktrov. Edino odstopanje je opazno pri površinskih vodah, kjer je gojišče Bolton brez krvi dal najslabše rezultate. Toda te rezultate bi še morali preučiti in potrditi z načrtno kontaminacijo površinskih vod. Prav tako nismo opazili, tako pri naravno kot načrtno kontaminiranih vzorcih, da bi kri inhibirala PCR reakcijo. Gojišči Bolton in Bolton brez krvi sta dali zelo primerljive vrednosti Ct.

## 5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov našega laboratorijskega dela lahko trdimo, da je:

- učinkovitost detekcije termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* odvisna od obogatitve in tipa vzorca. Vzrok za to je najverjetneje v različni sestavi mikrobne združbe. Na osnovi tega bi lahko izpopolnili gojišče Bolton + CAT, ki se je najbolje izkazalo v kombinaciji z molekularno detekcijsko metodo, a hkrati dalo slabe rezultate v kombinaciji s klasično metodo zaradi preslabe selektivnosti;
- kri ne inhibira PCR reakcije in v primeru preiskav vzorcev mesa tudi ne pospešuje rasti kampilobaktrov, saj se je gojišče Bolton brez krvi izkazalo enako dobro kot gojiše Bolton s krvjo;
- obogatitev v razmerju 1:4 je enako učinkovita kot obogatitev v razmerju 1:9, zato bi uvedba takega obogatitvenega razmerja v rutinskih preiskavah pomenila racionalizacijo stroškov materiala in dela;
- PCR v realnem času je bolj občutljiva detekcijska metoda v primerjavi s klasično metodo, kar smo potrdili s primerjalnimi analizami naravno in načrtno kontaminiranih vzorcev;
- detekcijo kampilobaktrov v vzorcih mesa in vod bi lahko izvajali samo z PCR v realnem času, in sicer izključno, kadar bi potrebovali rezultat ovredoten kot pozitiven/negativen. V kolikor pa bi potrebovali izolate, se izkaže klasična gojitvena metoda za nepogrešljivo.

## 6 POVZETEK

Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* so vodilni povzročitelji črevesnih okužb v razvitem svetu. Najdemo jih predvsem v perutninskem mesu, površinskih vodah in nepasteriziranem mleku, od koder se prenesejo v prehranjevalno verigo ljudi. Čeprav se niso sposobni razmnoževati v živilu, lahko povzročijo obolenje pri ljudeh, saj je infektivna doza potrebna za razvoj bolezni zelo majhna. Nedavne študije so ocenile, da se med 24-29 % primerov kampilobakterioze pri ljudeh pripiše ravnanju, pripravi in porabi piščančjega mesa, zato je pomembno, da se zavedamo vloge v preprečevanju okužb s kampilobaktrom z navzkrižno kontaminacijo. Čeprav je za kampilobakteriozo najbolj značilna driska, lahko pride tudi do komplikacij, kjer so posledice dolgotrajne. Najbolj znana zapleta kampilobakterioze sta artritis in Guillain-Barre sindrom, pri katerih pride do paralize. Potrebno še je veliko nadaljnjega dela, da bi odkrili vir teh organizmov, saj predstavljajo poglavitno skrb za javno zdravstvo, zato je toliko bolj pomembno, da se zavedamo resnosti te bakterije in poskušamo preprečiti okužbe s to bakterijo.

Vedno iščemo področja, ki jih lahko izboljšamo. Gojišča za izolacijo kampilobaktrov iz blata in drugih okolij, kot je hrana in voda še vedno niso optimalni, zato smo se v raziskovalnem delu osredotočili ravno na to področje. Prav tako smo vključili preučevanje tipa vzorcev v odvisnosti od izbire bogatitve in vpliv teh dveh parametrov na samo učinkovitost detekcije. V raziskavi se nismo ognili niti proučevanju vpliva metod, ki jih uporabljamo za detekcijo kampilobaktrov. Kot je navedeno v marsikateri študiji, so molekularne metode veliko bolj specifične, občutljive in hitre. V naši študiji smo uporabili PCR v realnem času, ki je najpogosteje uporabljena metoda v mikrobiološki diagnostiki, in nepogrešljivo klasično gojitveno metodo. Rezultati uporabljenih metod se precej razlikujejo, saj so odstopanja v številu pozitivnih rezultatov do 70 %. Z našo raziskavo primerljivosti metod lahko le potrdimo že večkrat navedena dejstva o večji specifičnosti molekularnih metod. Potrdimo lahko tudi naša predvidevanja o vplivu tipa vzorcev. Namreč, glede na tip vzorca moramo izbrati obogatitev, ki daje optimalne rezultate, saj ima vsak vzorec drugačno sestavo in drugačno kompetitivno bakterijsko mikrobioto. Zato se lahko določena obogatitev za nekatere vrste vzorcev izkaže za optimalno, za druge pa kot nasprotje za doseg optimalnih rezultatov.

Na osnovi zbranih rezultatov zaključujemo, da je učinkovitost detekcije termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* odvisna od obogatitve in tipa vzorca. Vzrok za to je verjetno v različni sestavi mikrobne združbe posameznih vzorcev. Na osnovi tega bi lahko izpopolnili gojišče Bolton + CAT, ki se je najbolje izkazalo v kombinaciji z molekularno detekcijsko metodo, a hkrati dalo slabe rezultate v kombinaciji s klasično metodo zaradi preslabe selektivnosti. Kri v obogatitvenem gojišču ne inhibira PCR reakcije in ne pospešuje rasti, saj se je gojišče Bolton brez krvi izkazalo enako dobro kot gojišče Bolton. Praktična ugotovitev, ki jo je dala ta raziskava, je tudi ta, da z uporabo obogatitve v manjšem razmerju pridobimo več pozitivnih rezultatov in nižje vrednosti Ct. Kot smo že navedli, bi bilo smiselno te ugotovitve prenesti v rutinske laboratorije, saj bi s tem zmanjšali stroške materiala in dela.

## 7 VIRI

Abulreesh H.H., Paget T.A., Goulder R. 2005. Recovery of thermophilic campylobacters from pound water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. *Water Research*, 39: 2877-2882.

Adams M. R., Moss M.O. 2008. *Food microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 192-198

Altmeyer M. Krabisch P., Dorn P. 1985. Vorkommen und zur Verbreitung von *Campylobacter jejuni/coli* in der Jungmastgeflügel-Produktion. 1. Mitteilung. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 92: 456-459.

Ang C. W., De Klerk M. A., Endtz H. P., Jacobs B. C., Laman J. D., van der Meché F. G. A., van Doorn P. A. 2001. Guillain-Barré syndrome- and Miller Fisher syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides induce anti-GM<sub>1</sub> and anti-GQ<sub>1b</sub> antibodies in rabbits. *Infection and Immunity*, 69, 4: 2462-2469.

Aspinall S.T., Wareing D.R.A., Hayward P.G., Hutchinson D.N. 1993. Selective medium for thermophilic campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Clinical Pathology*, 46: 829-831.

Aquino M.H.C., Filgueiras A.L.L., Ferreira M.C.S., Oliveira S.S., Bastos M.C., Tibana A. 2002. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 149-153.

BIOMMED. 2010. Quantitative real-time PCR. Louisiana, BIOMMED - Biotechnology and Molecular Medicine: 1 str.  
<http://biommed.lsu.edu/index.php> (februar 2010)

Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. Hughes T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infections in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 15: 472-479.

Bolton F.J., Coates D. 1983. A study of the oxygen and carbon dioxide requirements of thermophilic campylobacters. *Journal of Clinical Pathology*, 36: 829-834.

Bolton F.J., Robertson L. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni*. V: *Campylobacter: Epidemiology, pathogenesis and biochemistry*. Newell D.G. (ed.). Lancaster, MTB Press Ltd.: 75-76.

Carattoli A. 2001. Importance of integrons in diffusion of resistance. *Veterinary Research*, 32: 243-259.

Corry J.E.L., Post D.E., Colin P., Laisney M.J. 1995. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 43-76.

De Boer W., Hahne M. 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection*, 53: 1067-1068.

Deepak S.A., Kottapalli K.R., Rakwal R., Oros G., Rangappa K.S., Iwahashi H. Masuo Y., Agrawal G.K. 2007. Real-Time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*, 8: 234-251.

Dorrell N., Mangan J.A., Laing K.G., Hinds J., Linton D., Al-Ghusein H., Barrell B.G., Parkhill J., Stoker N.G., Karlyshev A.V., Butcher P.D., Wren B.W. 2001. Whole genome comparison of *Campylobacter jejuni* human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity. *Genome Research*, 11: 1706-1715.

Ekdahl K., Normann B., Andersson Y. 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis. *BMC Infectious Diseases*, 5, 11: 1-4.

Endtz H.P., Ang C.W., van den Braak N., Luijendijk A., Jacobs B.C., de Man P., van Duin J.M., van Belkum A., Verbrugh H.A. 2000. Evaluation of a new commercial immunoassay for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in stool samples. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 19: 794-797.

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D.C., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R., Smith T.F. 2006. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 1: 165-256.

Euzéby J.P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available in the Internet (<ftp://ftp.cict.fr/pub/bacterio/>). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 590-592.

Gibbens J.C., Pascoe S.J.S., Evans S.J., Davies R.H., Sayers A.R. 2001. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 48: 85-99.

Giriboni De Mello I.I. 2002. Factors affecting growth and culturing of *Campylobacter jejuni*. Doctoral dissertation. Florida, University of Florida: 272 str.

Goodman T.G., Hoffman P.S. 1983. Hydrogenase activity in catalase-positive strains of *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 18: 825-829.

Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins M.D., Sly L., McConnell W., Harper W.E.S. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. International Journal of Systematic Bacteriology, 39: 397-405.

Hansson I. 2007. Bacteriological and epidemiological studies of *Campylobacter* spp. in Swedish broilers. Doctoral dissertation. Uppsala, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health Uppsala: 11-56.

Helms M., Simonsen J., Olsen K.E., Molbak K. 2005. Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. Journal of Infectious Diseases, 191: 1050–1055.

Humphrey T., O' Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117: 237-257.

Hussain I., Mahmood M.S., Akhtar M., Khan A. 2007. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. Food Microbiology, 24, 3: 219-222.

Hutchinson D.N., Bolton F.J. 1984. Improved blood-free selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from faecal specimens. Journal of Clinical Pathology, 37: 956-957.

ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. part 1: Detection method. 2006: 16 str.

ISO 17995. Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. 2005: 14 str.

Jasson V., Sampers I., Botteldoorn N., Lopez-Gavez F., Baert L., Denayer S., Rajković A., Habib I., De Zuver L., Debevere J., Uyttendaele M. 2009. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. International Journal of Food Microbiology, 135: 248-253.

Josefsen M.H., Jacobsen N. R., Hoorfar J. 2004. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. Applied and Environmental Microbiology, 70: 3588–3592.

Karmali M.A., Simor A.E., Roscoe M., Fleming P.C., Smith S.S., Lane J. 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from faeces. Journal of Clinical Microbiology, 23: 456-459.

Katzav M., Isohanni M., Lund M., Hakkinen M., Lyhs M. 2008. PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. Food Microbiology, 25: 908-914.

Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143 : 5-21.

Khan I.U.H., Gannon V., Loughborough A., Jokinen C., Kent R., Koning W., Lapen D.R., Medeiros D., Miller J., Neuman N., Phillips R., Robertson W., Schreier H., Topp E., van Bohove E., Edge T.A. 2009. A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds. *Journal of Microbiological Methods*, 79: 307-311.

King E.O. 1957. Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *Journal of Infectious Diseases*, 101: 119-128.

Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 136 str.

Lastovica A.J., Le Roux E. 2001. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4222–4223.

Lindsay J. A. 1997. Chronic sequelae of foodborne disease. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 4: 443–452.

Ludwig W., Klenk H.-P. 2001. Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria*. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. (eds.). New York, Springer: 49–65.

Lund M., Nordentoft S., Pedersen K., Madsen M. 2004. Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 5125-5132.

Lübeck P.S., Wolfs P., On S.L.W., Ahrens P., Radström P., Hoorfar J. 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Assay development and analytical validation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 3664-5669.

Minihan D., Whyte P., O'Mahony M., Fanning S., McGill K., Collins J.D. 2004. *Campylobacter* spp. in Irish feedlot cattle: A longitudinal study involving pre-harvest and harvest phases of the food chain. *Journal of Veterinary Medical Science*, 51: 28–33.

Molins R.A., Motarjemi Y., Kaferstein F.K. 2001. Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods. *Food Control*, 12: 347–356.

Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B, Matsuda M., McDowell D.A., Mégraud F., Millar C.B., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P. 2005. *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 36: 351-382.





Pravilnik o kakovosti perutninskih mesnih izdelkov. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 85: 8767-8722.

Rantsiou K., Lamberti C., Cocolin L. 2010. Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 75-79.

Robinson D.A. 1981. Infectious dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282: 1584-1584.

Rollinson D.M., Colwell R.R. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 531-538.

Salazar-Lindo E., Sack R.B., Chea-Woo E., Kay B.A., Piscocoy Z.A., Leon-Barua R., Yi A. 1986. Early treatment with erythromycin of *Campylobacter jejuni*-associated dysentery in children. *Journal of Pediatrics*, 109: 355-360.

Sandberg M., Hofshagen M., Østensvik Ø., Skjerve E., Innocent G. 2005. Survival of *Campylobacter* on frozen broiler carcasses as a function of time. *Journal of Food Protection*, 68, 8: 1600-1605.

Schönberg-Norio D., Takkinen J., Hänninen M.L., Katila M.L., Kaukoranta S.S., Mattila L., Rautelin H. 2004. Swimming and *Campylobacter* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 10:1474-1477.

Sebald E.R., Véron, M. 1963. Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Annales de L'institut Pasteur (Paris)*, 105: 897-910.

Skirrow M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *British Medical Journal*, 2: 9-11.

Smole Možina S., Uzunović-Kamberović S. 2005. *Campylobacter* spp. as emerging food borne pathogen – incidence, detection and resistance. *Medicinski glasnik*, 2, 1: 2-15.

Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope - *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297-302.

Sorvillo F.J., Lieb L.E., Waterman S.H. 1991. Incidence of campylobacteriosis among patients with AIDS in Los Angeles County. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 4: 598-602.

Speegle L., Miller M.E., Backert S., Oyarzabal O.A. 2009. Use of cellulose filters to isolate *Campylobacter* spp. from naturally contaminated retail broiler meat. *Journal of Food Protection*, 72, 12: 2592-2596.

Steele T.W., McDermott S.N. 1984. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, 16: 263-265.

Stern N.J., Clavero M.R., Bailey J.S., Cox N.A., Robach M.C. 1995. *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poultry Science*, 74: 937-941.

Šikić M. 2007. Vpliv bakterijskega stresa na adhezivnost, invazivnost ter znotrajcelično preživelost in rast bakterij *Campylobacter* v celičnem modelu makrofagov J774 in celic Caco-2. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 108 str.

Tauxe R.V. 2002. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 31-41.

Taylor D. E., Courvalin P. 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 8: 1107-1112

Uhl J.R., Cockerill F.R.I. 2004. The fluorescence resonance energy transfer system. V: *Molecular microbiology diagnostic principles and practice*. Persing D.H., Tenover F.C., Versalovic J., Tang Y.W., Unger E.R., Relman D.A. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 295-306.

Van Deun K., Haesebrouck F., Heyndrickx M., Favoreel H., Dewulf J., Ceelen L., Dumez L., Messens W., Leleu S., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. 2007. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *Journal of Medical Microbiology*, 56: 1284-1289.

Vandamme P. 2000. Taxonomy of the family Campylobacteraceae. V: *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> ed. Nachamkin I., Blaser M. J. (eds.). Washington, D.C., ASM Press: 3-26.

Vandamme P., De Ley J. 1991. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 451-455.

Vandamme P., On S.L.W. 2001. Recommendations of the Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 51: 719-721.

Wallis M. R. 1994. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *British Journal of Biomedical Science*, 51, 1: 57-64.

Wang H., Ng L.-K., Farber, J. M. 2001. Detection of *Campylobacter jejuni* in thermophilic *Campylobacter* spp. from foods by polymerase chain reaction. V: Food microbiology protocols. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A. L. (eds.). Totowa, Humana Press Inc.: 95-106.

Whyte P., McGill K., Collins J.D. 2003. Assessment of commercial steam pasteurisation and hot water immersion treatments for the control of surface microbial contaminants on broiler carcasses. Food Microbiology, 20: 111–117.

Whyte P., Collins J.D., McGill K., Monahan C., O'Mahony H. 2001. Quantitative investigation of the effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. Journal of Food Protection, 64: 179–183.

Williams L.K., Jørgensen F., Grogono-Thomas R., Humphrey T.J. 2009. Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp.: Effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. International Journal of Food Microbiology, 130: 131-134.

Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51: 221-271.

Wolffs P., Norling B., Hoorfar J., Griffiths M., Rådström P. 2005. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to Real-Time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 71, 10: 5759-5764.

Yang C., Jiang Y., Huang K., Zhu C., Yin Y. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. Immunology and Medical Microbiology, 38: 265-271.

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici diplomske naloge prof. dr. Sonji Smole Možina za vso strokovno podporo, koristne napotke in prijaznost.

Hvala recenzentki prof. dr. Romani Marinšek Logar, ki je bila pripravljena prevzeti recenzijo in opravila pregled v dogovorjenem času.

Hvala mag. Mariji Lušicky, ki mi je omogočila praktično usposabljanje na Oddelku za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Prav tako gre zahvala Katji in Mojci za vso pomoč pri laboratorijskem delu in za pridobitev koristnih informacij.

Hvala vsem profesorjem in delavcem fakultete za trud.

Posebna zahvala gre staršem, prijateljicam in Vedranu, za vso podporo in pomoč, ki sem jo potrebovala.

Iskreno vam hvala!

## PRILOGE

Priloga A: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih površinskih vod.

Površinske vode			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 17995	PCR (Ct)
18755	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18756	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18757	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18758	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18759	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18760	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18568	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (32,86)
	Bolton + CAT	-	+ (28,44)
	Bolton brez krvi	-	-
18569	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18570	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18573	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
18187	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Priloga A: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih površinskih vod.

Površinske vode			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 17995	PCR (Ct)
18574	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (14,17)
	Bolton	<i>C. coli</i>	+ (19,58)
	Bolton + CAT	-	+ (20,72)
	Bolton brez krvi	<i>C. coli</i>	+ (33,50)
18575	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	<i>C. jejuni</i>	+ (11,74)
	Bolton brez krvi	-	-
18576	Preston	-	-
	Bolton	<i>C. coli</i>	+ (14,84)
	Bolton + CAT	-	+ (32,82)
	Bolton brez krvi	-	-
18581	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	<i>C. lari</i>	+ (28,94)
	Bolton brez krvi	-	-
18582	Preston	-	+ (28,52)
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
1	Preston	-	-
	Bolton	<i>C. jejuni</i>	+ (25,49)
	Bolton + CAT	-	+ (21,64)
	Bolton brez krvi	-	+ (31,97)
2	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (24,18)
	Bolton + CAT	-	+ (29,29)
	Bolton brez krvi	-	+ (34,51)
3	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
4	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (26,20)
	Bolton + CAT	-	+ (33,31)
	Bolton brez krvi	-	+ (33,42)
5	Preston	-	+ (34,27)
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
6	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (34,10)
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-

Se nadaljuje...

Nadaljevanje...

Priloga A: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 17995) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih površinskih vod.

Površinske vode			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 17995	PCR (Ct)
7	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (23,14)
	Bolton	-	+ (25,91)
	Bolton + CAT	-	+ (29,10)
	Bolton brez krvi	-	+ (33,85)
8	Preston	<i>C. upsaliensis</i>	+ (19,23)
	Bolton	-	+ (26,12)
	Bolton + CAT	-	+ (23,10)
	Bolton brez krvi	-	+ (34,85)
9	Preston	-	+ (18,31)
	Bolton	-	+ (26,98)
	Bolton + CAT	<i>C. jejuni</i>	+ (24,09)
	Bolton brez krvi	-	+ (33,53)
10	Preston	-	-
	Bolton	<i>C. coli</i>	+ (24,79)
	Bolton + CAT	+	+ (27,54)
	Bolton brez krvi	-	-
11	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (33,78)
	Bolton + CAT	-	+ (30,72)
	Bolton brez krvi	-	+ (31,82)
12	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (33,90)
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
13	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	+ (29,79)
	Bolton brez krvi	-	-
14	Preston	-	+ (33,45)
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	+ (31,42)
	Bolton brez krvi	-	-
15	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-

Priloga B: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranega piščančjega mesa.

Piščančje meso			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 10272-1	PCR (Ct)
60056	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (13,83)
	Bolton	+	+ (16,38)
	Bolton + CAT	-	+ (19,72)
	Bolton brez krvi	-	+ (13,46)
60057	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (14,99)
	Bolton	+	+ (14,05)
	Bolton + CAT	-	+ (18,93)
	Bolton brez krvi	+	+ (17,75)
60230	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (13,30)
	Bolton	-	+ (16,27)
	Bolton + CAT	-	+ (21,35)
	Bolton brez krvi	-	+ (17,57)
60231	Preston	-	+ (15,25)
	Bolton	-	+ (17,83)
	Bolton + CAT	-	+ (19,29)
	Bolton brez krvi	-	+ (19,59)
60232	Preston	-	+ (17,52)
	Bolton	-	+ (25,75)
	Bolton + CAT	-	+ (24,78)
	Bolton brez krvi	-	+ (18,19)
61034	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (12,37)
	Bolton	+	+ (12,17)
	Bolton + CAT	-	+ (18,90)
	Bolton brez krvi	+	+ (12,67)
61035	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (13,53)
	Bolton	+	+ (14,62)
	Bolton + CAT	-	+ (14,51)
	Bolton brez krvi	+	+ (14,70)
60977	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
60981	Preston	-	+ (16,79)
	Bolton	-	+ (14,39)
	Bolton + CAT	-	+ (18,73)
	Bolton brez krvi	<i>C. upsaliensis</i>	+ (16,96)
60982	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (19,22)
	Bolton	-	+ (15,73)
	Bolton + CAT	-	+ (20,52)
	Bolton brez krvi	-	+ (16,27)



Priloga C: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranih mesnih pripravkov.

Mesni pripravki			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 10272-1	PCR (Ct)
60074	Preston	<i>C. lari</i>	+ (14,69)
	Bolton	+	+ (14,34)
	Bolton + CAT	+	+ (14,82)
	Bolton brez krvi	+	+ (11,87)
60089	Preston	<i>C. lari</i>	+ (14,99)
	Bolton	+	+ (12,88)
	Bolton + CAT	+	+ (13,25)
	Bolton brez krvi	+	+ (12,69)
60094	Preston	+	+ (21,03)
	Bolton	+	+ (13,81)
	Bolton + CAT	+	+ (14,88)
	Bolton brez krvi	+	+ (12,52)
60127	Preston	-	+ (18,34)
	Bolton	<i>C. jejuni</i>	+ (15,63)
	Bolton + CAT	-	+ (18,37)
	Bolton brez krvi	+	+ (13,15)
60305	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
1	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
2	Preston	+	+ (17,70)
	Bolton	<i>C. lari</i>	+ (15,98)
	Bolton + CAT	+	+ (15,59)
	Bolton brez krvi	+	+ (14,28)
3	Preston	-	-
	Bolton	+	+ (14,10)
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	<i>C. jejuni</i>	+ (15,26)
4	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
5	Preston	-	-
	Bolton	-	+ (19,81)
	Bolton + CAT	-	+ (34,45)
	Bolton brez krvi	<i>C. lari</i>	+ (21,65)

Priloga D: Rezultati primerjalne analize detekcije kampilobaktrov s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih naravno kontaminiranega zamrznjenega piščančjega mesa.

Zamrznjeno piščančje meso			
Številka vzorca	Obogatitev	ISO 10272-1	PCR (Ct)
49600	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	+ (15,14)
	Bolton brez krvi	-	-
57357	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (14,44)
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	+	+ (14,15)
57360	Preston	-	-
	Bolton	+	+ (12,58)
	Bolton + CAT	<i>C. jejuni</i>	+ (18,85)
	Bolton brez krvi	-	-
57379	Preston	+	+ (14,11)
	Bolton	<i>C. jejuni</i>	+ (12,96)
	Bolton + CAT	-	+ (16,74)
	Bolton brez krvi	+	+ (14,17)
44733	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (13,37)
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	-
	Bolton brez krvi	-	-
47511	Preston	-	-
	Bolton	-	-
	Bolton + CAT	-	+ (31,89)
	Bolton brez krvi	-	-
55188	Preston	-	+ (14,37)
	Bolton	-	+ (13,96)
	Bolton + CAT	-	+ (17,70)
	Bolton brez krvi	<i>C. jejuni</i>	+ (15,27)
57356	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (14,28)
	Bolton	+	+ (13,91)
	Bolton + CAT	-	+ (19,25)
	Bolton brez krvi	+	+ (13,93)
57359	Preston	<i>C. jejuni</i>	+ (13,50)
	Bolton	+	+ (13,03)
	Bolton + CAT	-	+ (20,85)
	Bolton brez krvi	-	+ (14,71)
57381	Preston	+	+ (14,48)
	Bolton	<i>C. jejuni</i>	+ (12,70)
	Bolton + CAT	+	+ (13,71)
	Bolton brez krvi	+	+ (15,71)